

**Thrombin stimuliert die Migration von Zellen einer
HCC-Primärkultur über eine Wechselwirkung mit den
Proteinase-aktivierten Rezeptoren PAR₁ und PAR₄**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Kristin Zwenzner, geb. Pollrich
geboren am 27.08.1981 in Weida

Gutachter:

1. Prof. Dr. U. Settmacher, Jena
2. PD Dr. F. von Eggeling, Jena
3. Prof. Dr. H. Kosmehl, Erfurt

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.01.2010

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
AFP	alpha-Fetoprotein
Amniomax+S	AmnioMax TM -C100 Basal Medium + AmnioMax TM -C100 Supplement
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
Blotto	Blocklösung für Nitrozellulosemembran
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EK	Endkonzentration
ERK	extrazellulär Signal-regulierte Kinase
FHCC	fibrolammelläres hepatozelluläres Karzinom
FKS	Fetales Kälberserum
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	GTPase-Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GTPase	monomeres G-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-Rezeptorkinase
h	Stunde

HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEP-3B	humane Leberkarzinomzelllinie
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
KIE	Kallikrein-Inhibitor-Einheit
Konz.	Konzentration
l	Liter
M	molar (mol/l)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK-Kinase
MEKK	MAPK-Kinase-Kinase
mg	Milligramm
min	Minute
MKP	MAPK-Phosphatase
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar (mmol/l)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar (µmol/l)
ng	Nanogramm
NIH-U	internationaler Standard für die Thrombin-Gerinnungsaktivität
nm	Nanometer
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PAR	Proteinase-aktivierter Rezeptor
PAR-AP	PAR-aktivierendes Peptid
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pERK	phosphoryliertes ERK

PHC1	HCC-Primärkultur
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SK-HEP1	humane Leberkarzinomzelllinie
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered saline-buffer
TBS-T	TBS+Tween
Temed	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tfl	Thermus flavus
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
U/min	Umdrehung pro Minute
U/ml	Unit pro Milliliter
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vol%	Volumenprozent
°C	Grad Celsius
%	Prozent

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Zusammenfassung</u>	1
2.	<u>Einleitung</u>	3
2.1.	Das hepatozelluläre Karzinom	3
2.2.	Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PARs)	6
2.2.1.	PAR ₁ und PAR ₄	7
2.2.1.1.	Struktur	7
2.2.1.2.	Aktivierungsmechanismus	8
2.2.1.3.	G-Protein-Kopplung	9
2.2.1.4.	Signaltransduktion	10
2.2.1.5.	Inaktivierung	11
2.2.1.6.	Physiologische Funktionen	13
2.2.1.7.	Die Rolle in Tumoren	14
2.3.	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)	15
2.3.1.	p42/p44-MAPK	16
2.3.1.1.	Struktur	16
2.3.1.2.	Aktivierungsmechanismus	16
2.3.1.3.	Signaltransduktion	18
2.3.1.4.	Funktion	19
3.	<u>Zielstellung</u>	21
4.	<u>Material und Methoden</u>	22
4.1.	Material	22
4.1.1.	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien	22
4.1.2.	Rezeptoragonisten und -antagonisten	25
4.1.3.	MEK-(MAPK-Kinase)-Inhibitoren	26
4.1.4.	Puffer, Lösungen und Kulturmedien	26
4.1.5.	Geräte	28
4.2.	Methoden	29
4.2.1.	Die HCC-Primärkultur PHC1	29
4.2.1.1.	Kultivierung der Zellen	29
4.2.1.2.	Einfrieren der Zellen	30
4.2.1.3.	Auftauen der Zellen	30
4.2.2.	Zellzahlbestimmung	30
4.2.3.	Gesamt-RNA-Isolation	31

4.2.4.	Polymerasekettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese	31
4.2.5.	Herstellung der Zelllysate	32
4.2.6.	Proteinbestimmung	33
4.2.7.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
4.2.8.	Western Blotting	33
4.2.9.	Membran-Stripping und anti-p42/p44-MAPK-Blotting	34
4.2.10.	Untersuchungen zur chemotaktischen Migration	34
4.2.11.	Statistische Auswertung der Migrationsdaten	35
5.	<u>Ergebnisse</u>	36
5.1.	Nachweis von PAR ₁ , PAR ₃ und PAR ₄ in Zellen der HCC-Primärkultur PHC1	36
5.2.	PAR ₁ und PAR ₄ vermitteln in PHC1-Zellen einen migratorischen Effekt	37
5.3.	MAPK-Inhibitoren hemmen den PAR ₁ - und PAR ₄ -vermittelten Effekt auf die Migration von PHC1-Zellen	39
5.4.	PAR ₁ und PAR ₄ vermitteln in PHC1-Zellen eine p42/p44-MAPK- Aktivierung	40
6.	<u>Diskussion</u>	43
6.1.	Experimenteller Hintergrund und Auswahl des zellulären Modells	43
6.2.	PAR ₁ und PAR ₄ vermitteln einen migratorischen Effekt	44
6.3.	Der PAR ₁ - und der PAR ₄ - vermittelte Effekt auf die Migration von PHC1-Zellen ist MAPK-abhängig	46
6.4.	PAR ₁ und PAR ₄ vermitteln in PHC1-Zellen eine p42/p44-MAPK- Aktivierung	46
7.	<u>Schlussfolgerungen</u>	48
8.	<u>Literaturverzeichnis</u>	49
9.	<u>Anhang</u>	67

1. Zusammenfassung

Trotz großer medizinischer Fortschritte innerhalb der letzten Jahre sind die therapeutischen Möglichkeiten für das hepatozelluläre Karzinom (HCC), einem der weltweit häufigsten Malignome, nach wie vor äußerst limitiert. Unter den zahlreichen, aktuell im Fokus des onkologischen Interesses stehenden, molekularen Targetstrukturen befinden sich auch die Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PARs), eine relativ neue Gruppe G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Ihre Rolle wird insbesondere im Rahmen der Progression epithelialer Tumore diskutiert. Die eigene Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit einigen Jahren u.a. mit Untersuchungen zur Funktion des Systems Thrombin/Proteinase-aktivierte Rezeptoren im HCC. An den humanen Leberkarzinom-zelllinien HEP-3B und SK-HEP1 konnten erste Ergebnisse zur Funktion der PAR-Subtypen PAR₁ und PAR₄ im migratorischen Signaling dieser Zellen erzielt werden. An diese Ergebnisse anknüpfend ging es nun darum, mit Untersuchungen an Zellen einer Tumor-Primärkultur, die aus dem Gewebe eines chirurgisch entfernten HCCs etabliert wurde, einen weiteren Beitrag zur Charakterisierung der Funktion der PARs im HCC zu leisten. Nach Ermittlung der Expression auf RNA-Ebene sollte geklärt werden, ob PAR₁ und/oder PAR₄ auch in Zellen einer HCC-Primärkultur migratorische Effekte vermitteln. Auf der Ebene der intrazellulären Signalweiterleitung sollte eine Beteiligung von p42/p44-MAPK geklärt werden.

Zunächst erfolgte der Nachweis der Expression von PAR₁, PAR₃ und PAR₄ auf RNA-Ebene mit Hilfe der RT-PCR. Damit war die HCC-Primärkultur PHC1 für weitere Untersuchungen zur Funktion der PARs geeignet. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Thrombinrezeptoren PAR₁ und PAR₄ in HCC-Primärkulturzellen migratorische Effekte vermitteln und ob in diesen Prozess p42/p44-MAPK involviert sind, ein Enzymsystem, dessen wesentliche Rolle in der Hepatokarzinogenese bereits bekannt war. Zudem konnten PAR₁ und PAR₄ bereits in anderen Tumorentitäten nachgewiesen und für PAR₁ eine Beeinflussung der metastatischen Kapazität in verschiedenen epithelialen Tumoren gezeigt werden. Um die Effekte von PAR₁ und PAR₄ selektiv zu erfassen, wurden neben Untersuchungen mit Thrombin auch solche unter Verwendung von PAR₁- und PAR₄-selektiven Agonisten sowie Antagonisten durchgeführt.

Zur Erfassung der migratorischen Effekte wurde die Zellmigration durch eine Kollagen-beschichtete Polycarbonatmembran in einer modifizierten Boyden-Kammer untersucht. Sowohl die Stimulation mit Thrombin als auch mit dem PAR₁-selektiven Agonisten TFLLRN-NH₂ und dem PAR₄-selektiven Agonisten AYPGKF-NH₂ führte zu einer

signifikanten Erhöhung der migratorischen Kapazität der PHC1-Zellen. Der PAR₁-selektive Antagonist SCH79797 und der PAR₄-selektive Antagonist trans-cinnamoyl-YPGKF-NH₂ hemmten die Thrombin-stimulierte Migration von PHC1-Zellen. Daraus wurde geschlussfolgert, dass sowohl PAR₁ als auch PAR₄ am Effekt von Thrombin auf die Migration von PHC1-Zellen beteiligt sind, jedoch auch PAR₁- und PAR₄-unabhängige Mechanismen involviert sein können. Hier muss vor allem an den noch unzureichend untersuchten PAR₃ gedacht werden. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass Thrombin als Serinproteinase auch Rezeptor-unabhängige Prozesse durch katalytische Spaltung verschiedenster Proteine bzw. Enzyme auslösen kann, die möglicherweise zu einer Beeinflussung der Zellmigration führen.

Auf Signalweiterleitungsebene konnte in den Untersuchungen eine Beteiligung der p42/p44-MAPK am motogenen Signaling von PAR₁ und PAR₄ in HCC-Primärkulturzellen gezeigt werden. Dies wurde geschlussfolgert, da eine Vorinkubation der PHC1-Zellen mit den selektiven MEK-Inhibitoren PD98059 sowie SL327 zu einer signifikanten Hemmung sowohl des migratorischen Effekts des PAR₁-selektiven als auch des PAR₄-selektiven Agonisten führte. Mittels Western Blotting und einem gegen phosphorylierte und damit aktivierte p42/p44-MAPK gerichteten Antikörper konnte gezeigt werden, dass sowohl der endogene PAR-Ligand Thrombin als auch der selektive PAR₁- und der selektive PAR₄-Agonist eine p42/p44-MAPK-Aktivierung induzierten. Dabei war Thrombin sowohl nach Hemmung von PAR₁ als auch von PAR₄ nicht mehr in der Lage, p42/p44-MAPK zu stimulieren. Dies deutet auf eine funktionelle Interaktion von PAR₁ und PAR₄ hin, wonach die Hemmung des einen Rezeptors auch eine Beeinträchtigung bzw. den Verlust der Funktion des anderen nach sich zieht.

Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit an Zellen der HCC-Primärkultur PHC1 gezeigt werden, dass PAR₁ und PAR₄ regulatorisch in Migrationsprozesse dieser Zellen eingreifen, wobei ein MAPK-abhängiger Mechanismus beteiligt ist. Damit konnten die in der eigenen Arbeitsgruppe erzielten Ergebnisse an den humanen Leberkarzinomzelllinien HEP-3B und SK-HEP1 an primär kultivierten HCC-Zellen bestätigt werden. Da eine migratorische Fähigkeit von Tumorzellen eine essentielle Voraussetzung für die Tumormetastasierung darstellt, ist eine Funktion von PAR₁ und PAR₄ bei der Progression des HCC zu vermuten. Somit konnte ein weiterer Beitrag zur Erarbeitung von Grundlagen für einen Therapieansatz des HCCs geleistet werden, dessen Kernstück eine kombinierte Modulation des Thrombin-PAR₁/PAR₄-Systems und der PAR-vermittelten Aktivierung der p42-p44-MAPK bildet.

2. Einleitung

2.1. Das hepatozelluläre Karzinom

Bösartige Tumorerkrankungen sind nach Herz-/Kreislaferkrankungen in Deutschland bei Männern und Frauen die zweithäufigste Todesursache. Angesichts des zunehmenden Alterns der Bevölkerung und der weiter steigenden Lebenserwartung wird deren Bedeutung in der Gesundheitsversorgung der Bevölkerung künftig noch zunehmen. Im Jahr 2005 starben laut statistischem Bundesamt 216928 Menschen an einem Malignom (<http://www.destatis.de>).

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) gehört zu den fünf häufigsten Karzinomen und ist die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache weltweit (Okuda 2000, Parkin 2001). In den letzten Jahren ist eine steigende Inzidenz zu beobachten, was unter anderem durch eine Zunahme der viralen Hepatitiden bedingt ist (Greten et al. 2006).

Die Inzidenz des HCC liegt altersabhängig zwischen 5,5-14,9/100000/Jahr. Männer sind mit einem Verhältnis von 3:1 häufiger betroffen als Frauen (Llovet et al. 2003, Bosch et al. 2005).

In mehr als 80% ist die Ursache für die Entwicklung des HCC eine Leberzirrhose bzw. ein chronisch rezidivierender Leberschaden (Bosch et al. 2005, McKillop et al. 2006). Das größte Risiko entfällt dabei auf Patienten mit einer chronischen Hepatitis C- oder B-Infektion (Bosch et al. 2005). In den westlichen Industrienationen ist die alkoholbedingte Leberzirrhose eine häufige Ursache. Weitere Risikofaktoren sind die Hämochromatose, Aflatoxine in der Nahrung, die Steatohepatitis und Typ-2-Diabetes, verbunden mit Hyperinsulinämie und erhöhter IgF₁-Produktion (Bosch et al. 2005, Smedile und Bugianesi 2005, McKillop et al. 2006).

Die Hepatokarzinogenese folgt für gewöhnlich einem stets gleichen Ablauf von Nekrosen und entzündlichen Veränderungen in der Leber (Okuda 2000). In der entzündlich veränderten Leber entwickeln sich adenomatöse, hyperplastische Knoten. Diese dysplastischen Knoten gelten als HCC-Vorstufe, da sich bei nahezu der Hälfte der Patienten daraus ein frühes HCC entwickelt (Arakawa et al. 1986, Takayama et al. 1990, McKillop et al. 2006). Die maligne Umwandlung geht dabei mit einer Zellzunahme, einer irregulären dünn-trabekulären Struktur, Veränderungen der Fett- und Klarzellen sowie Zellinvasionen in das fibröse Stroma und in Gefäßwände einher (Okuda 2000). An den molekularen Mechanismen der Entwicklung sind unter anderem Mutationen des Tumorsuppressorgens p53, die Steigerung der MAPK-Expression sowie

die Expression verschiedener Gene, welche zur Aktivierung des Zellzyklus führen, beteiligt (Schmidt et al. 1997, Edamoto et al. 2003, McKillop et al. 2006).

Im Falle des hepatozellulären Karzinoms handelt es sich überwiegend um Adenokarzinome, in 20% kommt ein fibrolammelläres HCC (FHCC) vor. Makroskopisch lässt sich das HCC in vier Varianten einteilen: den infiltrativen HCC-Typ, den expansiven Typ, den gemischten expansiv-infiltrativen HCC-Typ und den diffusen Typ (Dietrich et al. 2003, Riede et al. 2004).

Das HCC verursacht in frühen Stadien, vor allem auch aufgrund der großen funktionellen Reserve der Leber, keine oder nur eine geringe Symptomatik und wird somit meist erst in fortgeschrittenen Stadien erkannt. Die Bestimmung des alpha-Fetoproteins (AFP) dient als nützlicher Tumormarker, AFP ist bei 50-80% der HCC-Patienten erhöht. Bei alleiniger Bestimmung besitzt AFP jedoch eine niedrige Sensitivität und Spezifität, da es auch bei benignen Leberveränderungen erhöht sein kann (Johnson 2000, Befeler und Bisceglie 2002, Geier et al. 2003). Ultraschalluntersuchungen sollten bei Risikopatienten (z.B. chronische Hepatitis-C) im halbjährlichen Abstand durchgeführt werden. Läsionen von einem Zentimeter und kleiner können so frühzeitig entdeckt werden. Allerdings ist diese Methode bei der Aufdeckung tiefliegender Läsionen bzw. Läsionen in stark zirrhotisch verändertem Lebergewebe eingeschränkt (Okuda 2000). Weitere diagnostische Möglichkeiten ergeben sich mit dem triphasischen Spiral-CT, dem Kontrastmittel-MRT, der Kontrastmittelsonographie sowie der sonografisch gesteuerten Biopsie (Strobel und Bernatik 2005, McKillop et al. 2005).

Zu den Spätsymptomen des HCC zählen ein tastbarer Abdominaltumor, Schmerzen im rechten Oberbauch und Zeichen der Leberinsuffizienz. Häufig kommen paraneoplastische Syndrome wie Polyglobulie, Hypercholesterinämie und Hypoglykämie vor (Henne-Bruns et al. 2003, Herold et al. 2006).

Die Ausbreitung des HCC erfolgt meist auf hämatogenem Weg mit der Bildung von Rezidiven in der Leber, sowie Metastasen in Lunge (30-50%), Zwerchfell (10-15%), Skelett (5-20%), Nebennieren, ZNS und Peritoneum (je 5-10%). Bei einem sehr geringen Prozentsatz kommt es zu einer lymphogenen Metastasierung v.a. in die peripankreatischen, periepigastischen und paraaortalen Lymphknoten sowie in die Lymphknoten im Leberhilus und Ligamentum hepatoduodenale (Riede et al. 2004).

Gängige Stadieneinteilungen des HCC sind die TNM-Klassifikation, Okuda, BCLC und CLIP, welche in unterschiedlichem Maße die Tumorausbreitung, die

Leberfunktionsstörung und den Allgemeinzustand des Patienten einbeziehen. Ein neuer, relativ unkomplizierter und gut reproduzierbarer Score ist der von Tateishi et al. (2004) entwickelte Tokyo-Score. Er wird aus den Faktoren Serum-Albumin, Bilirubin sowie Größe und Zahl der Tumore berechnet.

Da Patienten mit einem HCC in der Regel erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung diagnostiziert werden, ist ein kurativer Therapieansatz häufig nicht mehr möglich. Die mittlere Lebenserwartung für Patienten mit HCC in Deutschland liegt bei circa elf Monaten nach Diagnosestellung (Greten et al. 2005).

Eine kurative Therapie ist lediglich durch die chirurgische Resektion und Lebertransplantation möglich. Erstere ist häufig aufgrund der ausgeprägten Leberfunktionsstörung sowie dem fortgeschrittenen Tumorstadium kontraindiziert. Die chirurgische Resektion ist nur bei befriedigender Leberfunktion (Child-Pugh-Stadium A) sowie dem Auftreten singulärer kleiner Herde <5cm sinnvoll (5-Jahres-Überlebensrate etwa 33%). Für eine Lebertransplantation sind die Mailandkriterien wichtige Indikationsrichtlinien: keine extrahepatischen Tumore, solitärer Tumor <5cm oder multifokaler Tumor mit <4 Tumoren, jeweils <3cm. Der Mangel an Spenderorganen ist hier eine limitierende Größe. Eine mögliche Alternative bietet die Lebendspende (Bruix und Llovet 2002, Dietrich et al. 2003, Liu et al. 2004, McKillop et al. 2006). Als palliative Therapieoptionen kommen die Radiofrequenzablation, perkutane Äthanolinjektion, Laser- und Kryotherapie und die transarterielle Chemoembolisation zum Einsatz (Henne-Bruns et al. 2003, Birth 2005, McKillop et al. 2006).

Nach wie vor unbefriedigende Ergebnisse werden mit der systemischen Chemotherapie erzielt. Gegenwärtig existiert für das HCC noch keine wirksame systemische/medikamentöse Therapie. Die Testung verschiedener Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Cisplatin und 5-Fluorouracil sowie hormonelle Agenzien wie Tamoxifen und Immunmodulatoren wie alpha-Thymosin und Interferon erbrachte keinen signifikanten Überlebensvorteil (Castells et al. 1995, Llovet et al. 2003, Lu et al. 2004, Schwartz und Beutler 2004, Ikeda et al. 2005).

Insgesamt sind somit die therapeutischen Möglichkeiten für das HCC unzureichend und neue Ansätze dringend erforderlich. Deshalb ist man gegenwärtig u.a. intensiv mit einer detaillierten Aufklärung der molekularen Mechanismen der Hepatokarzinogenese befasst, um daraus neue Ansatzpunkte für systemische HCC-Therapieprinzipien abzuleiten. Die Untersuchungen der letzten Jahre machen deutlich, dass Entstehung und

Progression des HCC mit einer Vielzahl komplexer Veränderungen auf molekularer und zellulärer Ebene verbunden sind (Avila et al. 2006). Dabei ist auf der Ebene der intrazellulären Signalweiterleitung neben dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg offenbar insbesondere eine Rolle verschiedener intrazellulärer Effektuiierungsmechanismen kritisch, die durch MAPK und Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) initiiert werden (Villanueva et al. 2007). Gegenwärtig wird eine Kombinationstherapie zur Inhibierung mehrerer Rezeptorsysteme als ein sehr vielversprechendes Konzept mit Vorteilen gegenüber einer Monotherapie eingeschätzt (Höpfner et al. 2008). Insbesondere erste Ergebnisse mit dem Multi-Target-Inhibitor Sorafenib, einem für die Therapie des fortgeschrittenen HCC kürzlich zugelassenen Medikamentes unterstützen diese Strategie (Tanaka und Arai 2008). Im Falle von Sorafenib (Bay-43-9006) handelt es sich um einen sog. Multi-Kinaseinhibitor vom Typ der Acyl-Harnstoffderivate, der z.B. neben der Raf-Kinase, einem Schlüsselenzym im MAPK-Signaling, verschiedene Rezeptortyrosinkinasen inhibieren kann (Wilhelm und Chien 2002).

Aufgrund der eingeschränkten Therapieoptionen kommt der Prävention eine besondere Bedeutung zu. So kann durch die HBV-Impfung die weltweite Inzidenz des HCC stark reduziert werden. Eine HCV-Vakzine ist bislang nicht erhältlich. Die rechtzeitige Therapie der Hepatitis B oder C sowie anderer kausaler Erkrankungen kann die Entwicklung eines HCC verhindern bzw. hinauszögern (Chang et al. 1997, Herold et al. 2005, McKillop et al. 2006).

2.2. Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PARs)

Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PARs) gehören zur Superfamilie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCR), der größten Rezeptorenfamilie der Säugetiere. Gegenwärtig sind vier Subtypen charakterisiert: PAR₁ (Rasmussen et al. 1991, Vu et al. 1991a), PAR₂ (Nystedt et al. 1994), PAR₃ (Ishihara et al. 1997) und PAR₄ (Xu et al. 1998). PAR₁ und PAR₄ sind in erster Linie Rezeptoren für Thrombin. PAR₁ kann jedoch auch durch Streptokinase, Plasmin (Kuliopulos et al. 1999), Faktor Xa (McRedmond et al. 2000, Riewald und Ruf 2001), aktiviertes Protein C (Riewald et al. 2002), sowie durch Trypsin und Matrixmetalloprotease 1 (Boire et al. 2005) aktiviert werden. Da jedoch im Vergleich zu Thrombin wesentlich höhere Konzentrationen für eine Rezeptoraktivierung notwendig sind, ist eine Bedeutung dieser Proteinase als Rezeptoragonisten in vivo fraglich (Hollenberg und Compton 2002, Ossovskaya und Bunnett 2004, Boire et al. 2005). Eine PAR₄-Spaltung und Aktivierung ist auch für

Trypsin, Cathepsin G und die Gerinnungsfaktoren VIIa und Xa beschrieben (Hollenberg und Compton 2002). PAR₂ kann nicht durch Thrombin aktiviert werden, sondern ist Target für Trypsin, Mastzell-Tryptase, Matriptase-1, Tissue Factor/Gerinnungsfaktor VIIa/Gerinnungsfaktor Xa sowie Kallikreine (Steinhoff et al. 2005, Ramachandran und Hollenberg 2007).

2.2.1. PAR₁ und PAR₄

Da sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit PAR₁ und PAR₄ beschäftigt, beschränken sich die folgenden Ausführungen im Wesentlichen auf diese beiden PAR-Subtypen.

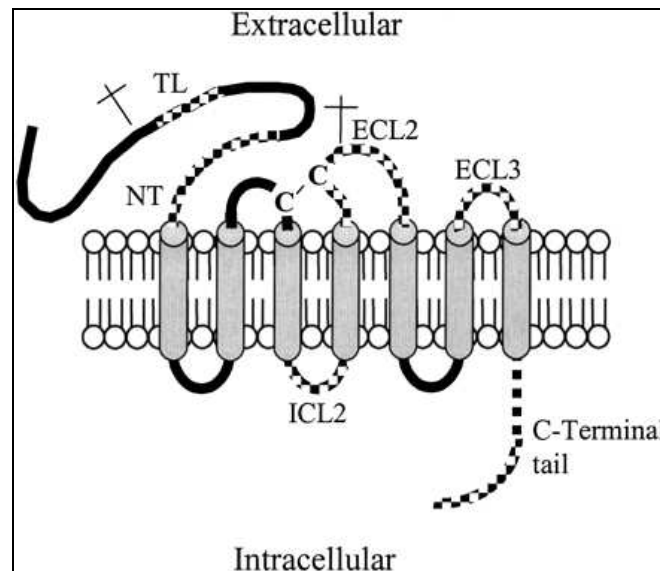


Abb. 1: Strukturschema der PARs

ECL: extrazellulärer Loop, ICL: intrazellulärer Loop, NT: N-Terminus, TL: „tethered ligand“ (nach Hollenberg und Compton 2002).

2.2.1.1. Struktur

Abbildung 1 zeigt die grundlegende Struktur der PARs. Im Falle von PAR₁ handelt es sich um ein aus 425 Aminosäuren bestehendes Protein mit den für GPCRs typischen sieben hydrophoben Domänen. Das Gen für PAR₁ liegt auf Chromosom 5, Region q13 und kodiert für eine 3,4kb mRNA. Dieses Protein enthält eine N-terminale hydrophobe Signalsequenz mit der potentiellen Spaltstelle für Thrombin (LDPR⁴¹ ↓ S⁴²FLLRN) (Vu et al. 1991b). Distal davon befindet sich eine hirudinähnliche negativ geladene Sequenz (D⁵¹KYEPF⁵⁶), welche komplementär zur Anionenbindungsstelle von Thrombin und

somit für die Rezeptoraffinität von Thrombin entscheidend ist (Ossovsckaya und Bunnett 2004, Rasmussen et al. 1991, Vu et al. 1991a, Hollenberg und Compton 2002).

Das PAR₄-Protein besteht aus 385 Aminosäuren mit einer potentiellen Spaltstelle für Thrombin und Trypsin im extrazellulären N-Terminus (PAPR⁴⁷ ↓ G⁴⁸YPGQV). Das Gen liegt auf dem Chromosom 19, Region q12 und kodiert für eine 2,7kb mRNA. 33% der Aminosäuresequenz sind identisch mit PAR₁, PAR₂ und PAR₃. Da bei PAR₄ eine hirudinähnliche Domäne wie in PAR₁ fehlt, bindet Thrombin auch lediglich mit einer etwa 50-100-fach niedrigeren Affinität als dies im Falle einer Interaktion mit PAR₁ der Fall ist (Ossovsckaya und Bunnett 2004, Xu et al. 1998, Kahn et al. 1998, Vu et al. 1991b).

2.2.1.2. Aktivierungsmechanismus

Die Proteinase-aktivierten Rezeptoren besitzen einen, von allen anderen G-Proteingekoppelten Rezeptoren abweichenden Aktivierungsmechanismus. Da dieser für PAR₁ am intensivsten untersucht und am besten aufgeklärt ist, soll er im Folgenden detailliert erläutert werden. In einem ersten Schritt bindet Thrombin im N-terminalen Bereich an PAR₁ und spaltet daraufhin den Rezeptor zwischen den Aminosäuren R⁴¹/S⁴², wodurch ein neuer N-Terminus (Neo-N-Terminus) entsteht. Dieser interagiert als gebundener Ligand („tethered ligand“) mit dem zweiten extrazellulären Loop des Rezeptors, so dass es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors kommt und nachfolgend durch Aktivierung von G-Proteinen die intrazelluläre Signalweiterleitung initiiert wird (Vu et al. 1991b, Gerszten et al. 1994, Nanevicz et al. 1995, Hollenberg und Compton 2002).

Neben dieser Aktivierung durch proteolytische Spaltung des Rezeptors können PARs auch durch synthetische Peptide aktiviert werden, die in ihrer Sequenz von den ersten 5-14 Aminosäuren des gebundenen Liganden abgeleitet sind (PAR₁-AP: SFLLR - SFLLRNPNDKYEPF; PAR₄-AP: GYPGQV - GYPGQVCANDSDTL). Dabei führt eine Wechselwirkung dieser PAR-aktivierenden Peptide (PAR-APs) mit dem zweiten extrazellulären Loop des Rezeptors zu dessen Aktivierung, ohne dass es einer Spaltung des Rezeptors bedarf (Vu et al. 1991a, Faruqi et al. 2000, Hollenberg und Compton 2002). Dieses Konzept gilt für PAR₁, PAR₂ und PAR₄, jedoch nicht für PAR₃, da PAR₃-analogue Peptide keine Aktivierung des PAR₃ induzieren (Ishihara et al. 1997), sondern eine Aktivierung von PAR₁ oder PAR₂ bewirken (Hansen et al. 2004, Kaufmann et al. 2005).

2.2.1.3. G-Protein-Kopplung

Die Proteinase-aktivierten Rezeptoren besitzen als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sieben transmembranale Helices, die durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Loops verbunden sind, sowie eine N- und eine C-terminale Domäne (Palczewski und Dawidowski 2000). Sie sind in der Lage, sowohl mit heterotrimeren, als auch mit monomeren G-Proteinen zu interagieren, wobei insbesondere der dritte intrazelluläre Loop für die Kopplung des Rezeptors mit dem G-Protein wesentlich ist (Cotecchia et al. 1992).

Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus den drei Untereinheiten $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$. Die zunächst inaktiven, GDP-gebundenen heterotrimeren G-Proteine dimerisieren durch den Austausch von GDP gegen GTP in $G\alpha$ -GTP und den $G\beta\gamma$ -Komplex. Die Signalweiterleitung kann sowohl über $G\alpha$ -GTP als auch über den $G\beta\gamma$ -Komplex erfolgen. Derzeit sind 20 $G\alpha$ -, 6 $G\beta$ - und 11 $G\gamma$ - Untereinheiten bekannt (Ross und Gilman 1980, Simon et al. 1991).

Die G-Proteine werden nach den Strukturen der α -Untereinheiten in vier Familien eingeteilt: $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$ (Lambright et al. 1994). $G\alpha_s$ aktiviert die Adenylatzyklase (AC), $G\alpha_{i/o}$ inhibiert AC, $G\alpha_{q/11}$ aktiviert die Phospholipase C (PLC), $G\alpha_{12}$ stimuliert Phospholipase D und Proteinkinase C (PKC) und $G\alpha_{13}$ wirkt über die Phosphatidylinositol-3-Kinase. Der $G\beta\gamma$ -Komplex kann das Signal unter anderem über Ionenkanäle und PLC weiterleiten (Clapham und Neer 1993, Clapham und Neer 1997, Neves et al. 2002).

Monomere G-Proteine

Gegenwärtig sind über 150 monomere G-Proteine bekannt. Sie werden auch als kleine GTPasen oder kleine GTP-bindende Proteine bezeichnet (Bourne et al. 1990, Takai et al. 2001). Die kleinen GTPasen werden in fünf Familien eingeteilt: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf und Ran. Derzeit sind vier Ras-, sechs Rho-, elf Rab-, sieben Sar1/Arf- und zwei Ran-Mitglieder bekannt (Lazar et al. 1997, Garcia-Ranea und Valencia 1998). In der Ras-Familie wurden bislang drei Ras-Proteine gefunden: Ha-Ras, Ki-Ras und N-Ras. Sie werden durch Tyrosinkinaserzeptoren, GPCRs, Ca^{2+} , Diacylglycerol und die $G\beta\gamma$ -Untereinheit stimuliert und regulieren hauptsächlich die Genexpression. Im menschlichen Organismus sind Ras-Gene an der Tumorzellproliferation beteiligt. Die

Rho-Familie reguliert neben der Genexpression auch das Cytoskelett (Takai et al. 2001).

Kleine GTPasen sind in GDP-gebundener Form inaktiv. Sie werden durch einen Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF), welcher durch ein Signal den Austausch von GDP gegen GTP katalysiert, aktiviert. GTPase-aktivierende Proteine (GAP), die das gebundene GTP zu GDP+P hydrolysieren, führen zur Inaktivierung der kleinen G-Proteine. Zusätzlich können G-Proteine durch GTPase-Dissoziationsinhibitoren (GDI) reguliert werden. Sie halten die G-Proteine in der GDP-gebundenen, inaktiven Form (Paduch et al. 2001).

2.2.1.4. Signaltransduktion

Die Signaltransduktion von PAR₁ (siehe Abb. 2) erfolgt über die Kopplung an heterotrimere oder monomere G-Proteine. PAR₁ interagiert vorwiegend mit G $\alpha_{q/11}$, G $\alpha_{12/13}$ und G α_i (Hung et al. 1992, Offermanns 2001). G $\alpha_{q/11}$ aktiviert die PLC- β und führt über die Bildung von Inositoltrisphosphat zur Mobilisierung von intrazellulärem Ca²⁺ und über Diacylglycerol zur Aktivierung der Proteinkinase C. Dieser Aktivierungsweg ist bedeutend bei der Thrombinaktivierung von PAR₁ in Fibroblasten und Thrombozyten (Babich et al. 1990, Hung et al. 1992, Macfarlane et al. 2001). Thrombin kann weiterhin Phospholipase A₂ und Phospholipase D stimulieren und die Ca²⁺-regulierte Proteinkinase Pyk-2 sowie die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) aktivieren (Keogh et al. 2002, Ossovskaya und Bunnett 2004).

Eine Kopplung über G $\alpha_{12/13}$ spielt eine Rolle bei der Regulation der Zellteilung und der Migration. Im Falle der Aktivierung von Blutplättchen durch Thrombin kommt es durch eine derartige G-Proteinkopplung zu einer Formänderung der Thrombozyten vom discoiden zum spheroide Typ und zur Ausbildung von Pseudopodien. G $\alpha_{12/13}$ interagieren über GEFs mit den kleinen GTPasen der Rho-Familie und führen so z.B. zur Aktivierung der Rho-Kinase oder der Myosin-Leichtkettenkinase (Offermanns et al. 1994, Klages et al. 1999, Ossovskaya und Bunnett 2004).

Durch Aktivierung von G α_i wird die Adenylatzyklase inhibiert, was zu einem intrazellulären Abfall von cAMP führt (Hung et al. 1992, Kanthou et al. 1996).

PAR₁ vermittelt Signale auch durch Kopplung an G $\beta\gamma$ über die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI₃K). Diese aktiviert dann unter anderem MAPK vom p42/p44-Typ (Wang et al. 2002). Zudem ist PAR₁ z.B. in Enterozyten und Nierenkarzinomzellen in der Lage, eine Phosphorylierungsaktivierung des EGF-

Rezeptors über eine sog. Rezeptor-Transaktivierung mit nachfolgender Aktivierung von p38-MAPK bzw. p42/p44-MAPK zu vermitteln (Buresi et al. 2002, Sabri et al. 2002, Bergmann et al. 2006).

Von PAR₄ ist bisher sehr wenig zur G-Protein-Kopplung und der nachfolgend initiierten Signalweiterleitung bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass der aktivierte Rezeptor über G $\alpha_{q/11}$ einen Anstieg von freiem intrazellulären Ca²⁺ vermittelt (Verall et al. 1997, Kaufmann et al. 2000). Zudem führt die Aktivierung von PAR₄ mit Thrombin und Trypsin zur Hydrolyse von Phosphoinositolbisphosphat (Xu et al. 1998).

Sabri et al. (2003) konnten eine PAR₄-vermittelte Transaktivierung des EGFR via p38-MAPK in Herzmuskelzellen nachweisen. Diese Transaktivierung ist PAR₁-unabhängig und scheint am Herzmuskelremodeling sowie an Umbauprozessen nach Entzündungen des Herzmuskels beteiligt zu sein.

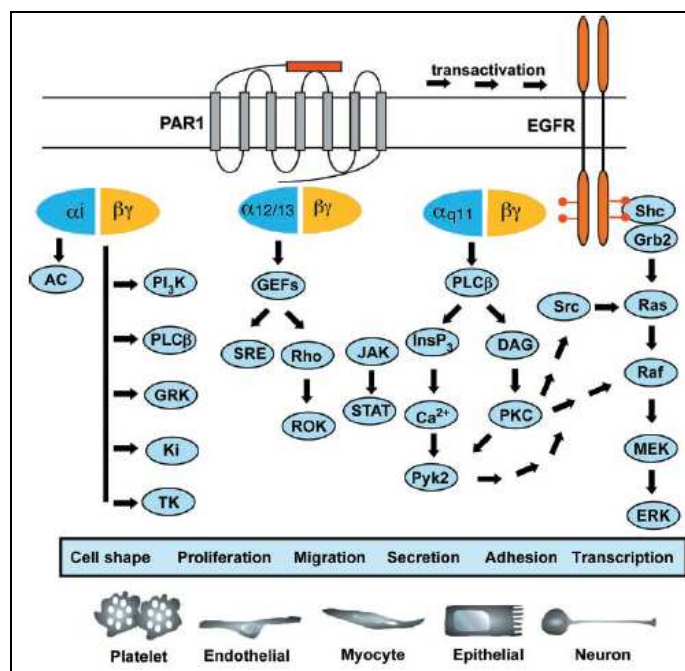


Abb. 2: Übersicht über wesentliche Signaltransduktionswege von PAR₁

AC: Adenylatzyklase, GEF: Guaninnukleotid-Exchange-Faktor, ROK: Rho-Kinase, SRE: serum response elements, PLC β : Phospholipase β , DAG: Diacylglycerol, PKC: Proteinkinase C, EGFR: EGF-Rezeptor, PI₃K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, GRK: G-Proteinrezeptorkinase, Ki: Kaliumkanal, TK: Tyrosinkinase (nach Ossovskaya und Bunnett 2004).

2.2.1.5. Inaktivierung

Während üblicherweise die Inaktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch eine Dissoziation des Agonisten vom Rezeptor und der anschließenden Internalisierung des Rezeptors realisiert wird (Böhm et al. 1997), erfolgt die Inaktivierung der Proteinase-

aktivierten Rezeptoren durch andere Mechanismen. Dies ist erforderlich, da der Ligand (Agonist) als Teil des Rezeptor-N-Terminus nach erfolgter Rezeptoraktivierung nicht von diesem dissoziieren kann.

Die Rezeptordesensitivierung erfolgt deshalb durch Phosphorylierung am intrazellulären C-Terminus oder am intrazellulären Loop 3, vermittelt durch G-Protein-Rezeptorkinasen (GRKs) oder second messenger Kinasen. GRKs sind Serin-Threonin-Kinasen. β -Arrestin als Cofaktor der GRKs interagiert mit GRK-phosphorylierten PARs, unterbricht dessen G-Protein-Kopplung und führt so zur Desensitivierung des Rezeptors (Böhm et al. 1997, Luttrell und Lefkowitz 2002, Paing et al. 2002, Ossovskaya und Bunnett 2004). Zudem ist für PARs eine Agonist-induzierte Rezeptorendozytose nachweisbar, im Verlauf derer die Mehrzahl der internalisierten Rezeptoren lysosomal degradiert werden. Interessanterweise konnte für PAR₁ und PAR₄ gezeigt werden, dass ein kleiner Anteil der proteolytisch gespaltenen Rezeptoren einige Minuten nach Desensitivierung wieder an der Zelloberfläche erscheint. Diese Rezeptormoleküle können z.B durch Thrombin nicht mehr aktiviert werden, jedoch ist die Aktivierung durch die synthetischen PAR-APs weiterhin möglich. Die Bedeutung eines solchen Mechanismus in vivo ist bisher unklar (Hoxie et al. 1993, Hein et al. 1994, Déry et al. 1998, Kaufmann und Westermann, unveröffentlichte Ergebnisse). Weiterhin scheint es eine permanente Wanderung von Rezeptormolekülen zwischen der Zelloberfläche und intrazellulären Speichern zu geben, wodurch die Zellen in der Lage sind, nach einer Spaltung mit anschließender Rezeptorinternalisierung Rezeptoren aus diesen Reservespeichern an die Zelloberfläche zu transportieren. Dadurch kann eine erneute Bereitschaft der Zellen zur Wechselwirkung mit einem Agonisten kurzfristig und ohne Neusynthese von Rezeptoren hergestellt werden (Hein et al. 1994, Déry et al. 1998, Shapiro und Coughlin 1998, Macfarlane et al. 2001, Hollenberg und Compton 2002).

PAR₁ und PAR₄ unterscheiden sich hinsichtlich der Kinetik ihrer Rezeptorinaktivierung und -internalisierung (Hollenberg und Compton 2002). PAR₄ wird nach Thrombinstimulation langsamer desensitiviert als PAR₁ (Shapiro et al. 2000). Dies wird durch das Fehlen einer Sequenz im COOH-Terminus erklärt, welche für die Kopplung an G-Protein-Rezeptor-Kinasen (GRKs) wichtig ist (Macfarlane et al. 2001).

Schließlich sind Proteinasen wie Cathepsin G, Elastase oder Proteinase 3 in der Lage, PAR₁ außerhalb der aktivierenden Region zu aktivieren, wodurch der Rezeptor jedoch

trotzdem in einen nichtaktivierbaren Zustand versetzt wird (Molino et al. 1995, Renesto et al. 1997).

2.2.1.6. Physiologische Funktionen

Der physiologisch relevante, endogene Rezeptoragonist für PAR₁ ist die Serinproteinase Thrombin, die ubiquitär im Körper vorkommt (Hollenberg und Compton 2002). In Abbildung 3 sind die wesentlichen Funktionen der PARs verdeutlicht.

PARs werden unter anderem auf glatten Muskelzellen des Endothels und der Blutgefäße sowie auf Thrombozyten exprimiert. Humane Thrombozyten besitzen PAR₁ und PAR₄ (Kahn et al. 1999), Neutrophile PAR₂ (Howells et al. 1997), humane Endothelzellen der Umbilikalvenen PAR₁, PAR₂ und PAR₃ (Mirza et al. 1996, O'Brien et al. 2000), glatte Gefäßmuskelzellen PAR₁ und PAR₂ (D'Andrea et al. 1998). Somit greifen PARs in die Thrombozytenaggregation und Granulasekretion der Thrombozyten ein und induzieren prokoagulante Aktivitäten. Sie kontrollieren durch Beeinflussung der Endothelzellen und der glatten Gefäßmuskelzellen den Gefäßwiderstand, den Blutfluss, die Gefäßpermeabilität für Plasmazellen und Granulozyten und die Angiogenese (Coughlin 2000, Ossovskaya und Bunnett 2004).

Auch im Nervensystem konnten PAR₁ und PAR₄ nachgewiesen werden, wo sie das neurogene Entzündungsgeschehen, neurodegenerative Prozesse und die Nozizeption beeinflussen (Cocks und Moffatt 2000, de Garavilla et al. 2001, Wang et al. 2002).

Im Gastrointestinaltrakt wurde PAR₁ in Zellen der Lamina propria des Dünndarms, in intestinalen Epithelzellen, glatten Muskelzellen und in Neuronen des enterischen Nervensystems nachgewiesen (Böhm et al. 1996, Corvera et al. 1999, Vergnolle 2000). PAR₄ wurde in Pankreas-, Dünndarm- und Kolonzellen nachgewiesen (Kahn et al. 1998, Xu et al. 1998). PARs beeinflussen die Flüssigkeitssekretion im Darm, den Ionentransport im Pankreas, die Darmmotilität, die exokrine Sekretion des Pankreas, des Magens und der Speicheldrüsen, das enterische Nervensystem und intestinale Entzündungsprozesse (Vergnolle 2000, Ossovskaya und Bunnett 2004).

Der Nachweis von PAR₁ und PAR₂ gelang auch in verschiedenen Zellen des Bronchialsystems, wo sie bei akuten und chronischen Entzündungsprozessen sowie bei Traumata eine Rolle spielen (Howell et al. 2002).

In verschiedenen Hautzellen konnten PAR₁ und PAR₂ nachgewiesen werden. Sie greifen in Prozesse der Hautproliferation, der Wundheilung, der Pigmentierung und der Entzündung ein (Rattenholl und Steinhoff 2003).

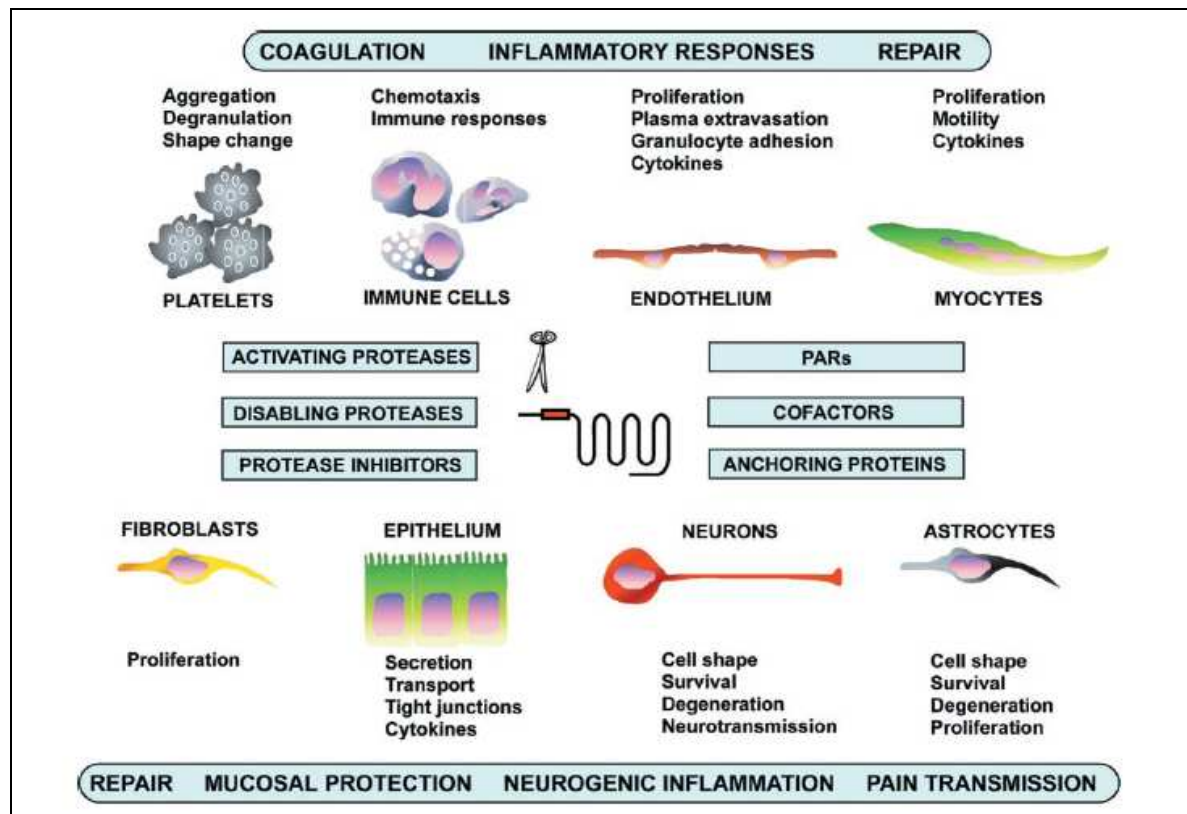


Abb. 3: Zusammenfassung wesentlicher physiologischer und pathophysiologischer Funktionen von PARs in verschiedenen Zellarten

(nach Ossovskaya und Bunnett 2004).

2.2.1.7. Die Rolle in Tumoren

PAR₁ konnte außer in vielen nichtneoplastischen Zellarten auch in verschiedenen Tumorzellen wie humanen Nierenzellkarzinom- (Kaufmann et al. 2002), Kolonkarzinom- (Darmoul et al. 2003), Pankreaskarzinom- (Rudroff et al. 1998), Astrozytom- (Kaufmann et al. 2000) und Glioblastomzellen (Kaufmann et al. 1998) nachgewiesen werden. In humanen Leberzellkarzinomzellen gelang ebenfalls der Nachweis von PAR₁ (Rullier et al. 2005).

Es ist bekannt, dass Proteinasen die Eigenschaften der Mikroumgebung von Tumoren über eine Wechselwirkung mit PARs wesentlich prägen. So beeinflussen beispielsweise von malignen Zellen sezerniertes Thrombin und Trypsin die Proliferation und Metastasierungsprozesse wie die zelluläre Invasion, den Umbau der extrazellulären Matrix, die Angiogenese und das Geweberemodeling (Ossovskaya und Bunnett 2004). Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Überaktivierung der Blutgerinnung und der Tumorprogression. So ist bekannt, dass die Bindung von Tumorzellen an durch Thrombin aktivierte Thrombozyten und Endothelzellen sowie Fibrin für das Überleben und die Metastasierung von Tumorzellen essentiell sind (Gasic et al. 1968, Rickles und

Edwards 1983, Palumbo et al. 2000, Camerer et al. 2004, Arora et al. 2007). Weiterhin konnte eine Interaktion zwischen dem Tumorsuppressorgen p53 und der Expression von PAR₁ gezeigt werden (Salah et al. 2008).

In Brusttumorgewebe metastasierender Tumore konnte PAR₁ in den glatten Gefäßmuskelzellen der Tumormikroumgebung nachgewiesen werden, wohingegen der Nachweis in nicht metastasierenden Tumoren und benignen Gewebe nicht möglich war. Zudem gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Höhe der PAR₁-Expression und dem Invasionsgrad des Mammakarzinoms (Even-Ram et al. 1998, D'Andrea et al. 2001).

In Pankreaskarzinomzellen scheint die Höhe der PAR₁-Expression mit dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen zu korrelieren (Rudroff et al. 2002). Somit kann die Höhe der PAR₁-Expression ein Marker für die Metastasierungsmöglichkeit eines Tumors sein und damit einen diagnostischen und prognostischen Wert bekommen. Über eine Aktivierung von PAR₁ in Makrophagen, Muskelzellen und Endothelzellen der Tumormikroumgebung ist zudem die Freisetzung von Zytokinen und Hormonen denkbar, wodurch bekanntermaßen die Eigenschaften des Tumors beeinflusst werden können (D'Andrea et al. 2001).

Bergmann et al. (2006) konnten in Nierenzellkarzinomzellen eine Beeinflussung der Zellmotilität durch eine PAR₁-vermittelte Transaktivierung des EGFR nachweisen. In Kolonkarzinomzellen konnte eine erhöhte Expression von PAR₄ gezeigt werden. Zudem wurde gefunden, dass die PAR₄-induzierte Aktivierung von MAPK die Proliferation dieser Tumorzellart beeinflusst (Gratio et al. 2008).

2.3. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

MAPK sind Serin-Threonin-spezifische Proteinkinasen, welche durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Hormone und andere GPCR-Liganden aktiviert werden können. Die MAPK werden in drei Hauptfamilien unterteilt: durch extrazelluläre Signale regulierte MAPK, p-38 MAPK (MAPK^{p38}) und c-Jun N-terminale Kinasen (MAPK^{jnk}). Sie werden in einer Vielzahl eukaryontischer Zellen exprimiert und sind an Signalwegen zur Regulierung der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation, der Zellmigration und des Zelltodes beteiligt (Widmann et al. 1999, Pearson et al. 2001, Farooq und Zhou 2004).

Die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen bilden die am intensivsten untersuchte MAPK-Subfamilie. Zu ihr gehören ERK1/2 (p42/p44-MAPK), ERK3, ERK4, ERK5 sowie ERK6, ERK7 und ERK8 (Bogoyevitch und Court 2004).

2.3.1. p42/p44-MAPK

Da sich die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen auf p42/p44-MAPK konzentrieren, beschränken sich die folgenden Ausführungen auf diese Mitogen-aktivierten Proteinkinasen.

2.3.1.1. Struktur

p42/p44-MAPK besitzen ein Molekulargewicht von 42 bzw. 44kDa und eine Sequenzhomologie von etwa 83% (Boulton et al. 1990, Boulton et al. 1991, Chen et al. 2001). Die Aktivität dieser MAPK wird durch die zweifache Phosphorylierung eines sog. Aktivierungsloops gesteuert. Dieser besitzt eine Sequenz mit einem Tyrosin¹⁸⁵-Glutamat¹⁸⁴-Threonin¹⁸³-Motiv (T-E-Y-Motiv), an welchem eine durch eine MAPK-Kinase (MEK) katalysierte Phosphorylierung der Aminosäuren Tyrosin und Threonin zur p42/p44-MAPK-Aktivierung führt (Payne et al. 1991, Ahn et al. 1991, Widmann et al. 1999, Farooq und Zhou 2004). Zudem gibt es Hinweise, dass eine so genannte CD (common docking)-Region eine wichtige Rolle für die MEK-Bindung und damit für die p42/p44-MAPK-Aktivierung spielt. Schließlich konnte auch gezeigt werden, dass der Aminoterminus von p42/p44-MAPK für die Interaktion mit MEK-Enzymen wesentlich ist (Pearson et al. 2001).

2.3.1.2. Aktivierungsmechanismus

Die Aktivierung von p42/p44-MAPK verläuft über verschiedene, hintereinander geschaltete Phosphorylierungsschritte, bei denen, wie in Abbildung 4 ersichtlich, drei sich gegenseitig phosphorylierende Kinasen wesentlich sind.

So aktivieren MAPK-Kinasen (MEK), wie z.B. MEK1 und MEK2, p42/p44-MAPK durch zweifach-spezifische Phosphorylierung am Threonin- und Tyrosinrest im Motiv T-E-Y. Dabei reicht die Tyrosinphosphorylierung allein noch nicht zur p42/p44-MAPK-Aktivierung, sondern nach einer gewissen Akkumulation phosphorylierter Tyrosinreste ist noch eine Threoninphosphorylierung erforderlich. MEKs werden ihrerseits durch MAPK-Kinase-Kinasen (MEKK), wie z.B. Raf-1 phosphoryliert und damit aktiviert. Diese Aktivierungskaskade ermöglicht sowohl eine Amplifizierung des

Signals, als auch regulatorische Anpassungen auf den unterschiedlichen Ebenen (Pearson et al. 2001, Schramek 2002).

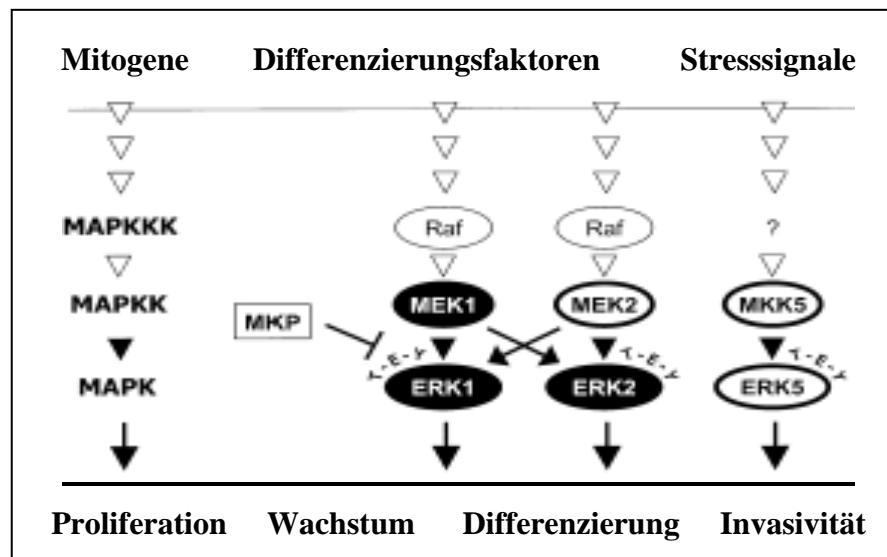


Abb. 4: Aktivierungskaskade der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen und ihre möglichen zellulären Effekte

ERK: extrazellulär Signal-regulierte Kinase, MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase, MAPKK: MAPK-Kinase, MAPKKK: MAPK-Kinase-Kinase, MKP: MAPK-Phosphatase, ERK1: p44-MAPK, ERK2: p42-MAPK (nach Schramek 2002).

Neben o.g. Aktivierungskaskade können p42/p44-MAPK auch alternativ über andere, interferierende Signaltransduktionswege aktiviert werden („cross-activation“) und dadurch Signale entweder verstärkt oder abgeschwächt werden, z.B. über Rho-Proteine (Frost et al. 1997).

Die Raf-Isoformen und Mos scheinen bis dato die einzigen MEKKs zu sein, welche MEKs phosphorylieren und damit aktivieren können. Die Raf-Familie besteht aus A-Raf, B-Raf und Raf₁ (oder C-Raf), wobei Raf₁ aufgrund seines vielfältigen Vorkommens bislang am besten untersucht wurde. Die Regulation von Raf₁ ist äußerst komplex. Wesentlicher Bestandteil zur Aktivierung ist die Bindung an das durch GTP aktivierte kleine G-Protein Ras und die anschließende Phosphorylierung verschiedener Serin- und Tyrosinreste. Einige dieser Reste werden auch durch Src-Proteinkinasen, PKC und andere Kinasen phosphoryliert. Weiterhin umfasst die Regulierung Protein-Protein-Interaktionen sowie die zelluläre Lokalisation der MEKKs (Dent et al. 1995, Morrison und Cutler 1997, Hagemann und Rapp 1999, Widmann et al. 1999, Chen et al. 2001, Pearson et al 2001).

Die Regulation der MAPK erfolgt zum einen über den stimulierenden Einfluss der Kinasen und das Vorhandensein bestimmter Substrate, zum anderen über die Inaktivierung der MAPK durch MAPK-Phosphatasen (MKPs). MKPs gehören zur Familie der Proteinphosphatasen. Sie dephosphorylieren die Threonin- und/oder Tyrosinreste im T-E-Y-Motiv der MAPK. Sie werden in drei Hauptgruppen eingeteilt, abhängig von der Dephosphorylierung von Tyrosin, Serin/Threonin oder zweifach-spezifisch Threonin und Tyrosin (Pearson et al. 2001, Farooq und Zhou 2004).

2.3.1.3. Signaltransduktion

Die von einer Vielzahl von Stimuli induzierte p42/p44-MAPK-Aktivierung wird in erster Linie über Tyrosinkinaserzeptoren sowie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt (siehe Abb. 5).

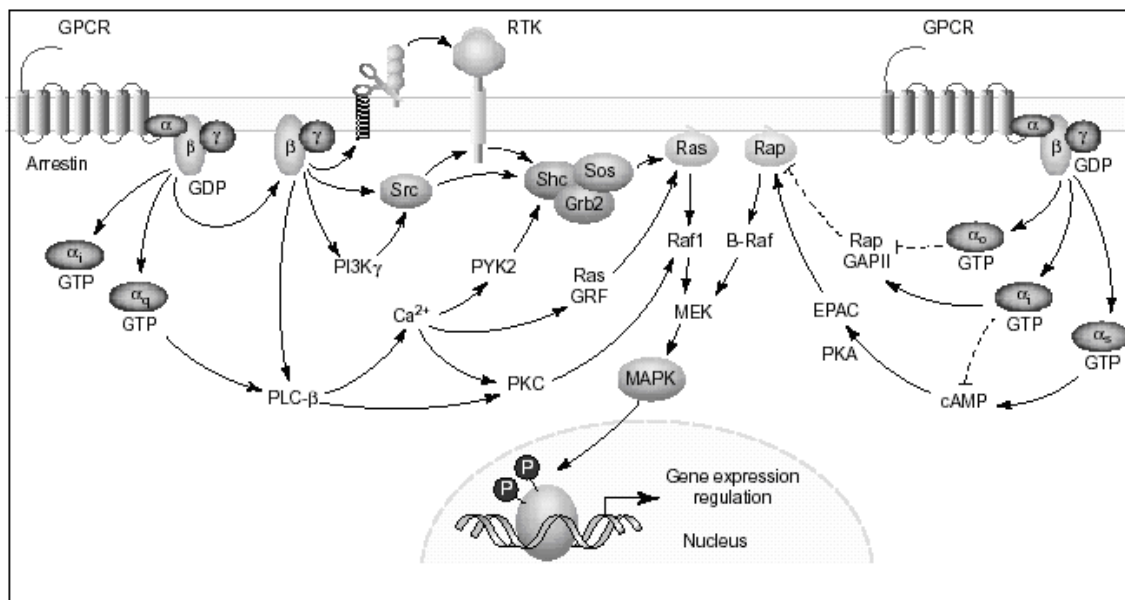


Abb. 5: Übersicht über unterschiedliche Aktivierungsmöglichkeiten der MAPK durch GPCRs

GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor, MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase, PLC- β : Phospholipase C- β (nach Marinissen und Gutkind 2001).

Den Ausgang der p42/p44-MAPK-Signalkaskade bildet das Ras-Protein. Dieses interagiert mit Ras-GEFs, so dass es nachfolgend im Ras-Protein durch Austausch von GDP gegen GTP zu dessen Aktivierung kommt. Aktiviertes Ras tritt direkt mit der N-terminalen Domäne von Raf-1 (MEKK) in Wechselwirkung und bewirkt so dessen Rekrutierung an die Plasmamembran (Fu et al. 1994, Marais et al. 1995, Katz und McCormick 1997). Auch GPCRs stimulieren MAPK durch Aktivitätssteigerung von Raf-Isoformen über eine Vielzahl von Mechanismen, abhängig von der Klasse der G-

Proteine, dem Zelltyp und der Expression von Effektormolekülen (Pawson und Scott 1997, Chen et al. 2001).

Eine weitere Zwischenstufe in der p42/p44-MAPK-Aktivierung ist MEK, ein direktes Substrat von Raf-1. Nach Aktivierung von MEK ist diese in der Lage, p42/p44-MAPK zu aktivieren. p42/p44-MAPK werden nun durch passive Diffusions- oder aktive Transportmechanismen in den Zellkern transloziert, wo sie nukleäre Enzyme sowie Transkriptionsfaktoren aktivieren. p42/p44-MAPK sind aber auch in der Lage, an Membranproteine und zytoplasmatische Proteine zu binden und so in Regulationsmechanismen des Zytoskeletts einzugreifen (Payne et al. 1991, Pawson und Scott 1997, Pearson et al. 2001, Schramek 2002).

2.3.1.4. Funktion

Die Funktion der p42/p44-MAPK wird durch deren Vorkommen, der Verfügbarkeit von Substraten sowie dem Aktivitätszustand der Zellen bestimmt. Durch Einwirkung kurz- oder langfristiger extrazellulärer Signale kann der Aktivitätszustand verändert werden. p42/p44-MAPK sind in der Lage, Transkriptionsfaktoren zu regulieren und mit Membranproteinen, Proteinen des Zytoskeletts und des Zytoplasmas sowie mit nukleären Proteinen zu interagieren (Chen et al. 2001, Pearson et al. 2001). Auch andere Proteinkinasen wie Rsk1-3, MAPK-2 und -3, Mnk1 und Mnk2 werden aktiviert (Waskiewicz et al. 1997, Chen et al. 2001, Pearson et al. 2001).

p42/p44-MAPK beeinflussen so u.a. die Genexpression, Apoptosemechanismen, die Reorganisation des Zytoskeletts, den Zellmetabolismus und die Zelladhäsion. Über Carbamylphosphat wird die Zellproliferation durch Beeinflussung der Pyrimidinnukleotidsynthese, einem Bestandteil der RNA und DNA, beeinflusst. Rsk2 phosphoryliert Serinreste des Histons H3, einem Kernprotein des Nucleosoms, wodurch direkt die frühe Genexpression, das Chromatinremodeling und die Chromatinkondensation während der Mitose aktiviert werden. p42/p44-MAPK verstärken die Proteinbiosynthese durch zusätzliche Rekrutierung von Ribosomen. Auch Mnk1 und 2 sind in der Lage, die Proteinbiosynthese zu steigern (Thomson et al. 1999, Chen et al. 2001, Pearson et al. 2001, Schramek 2002).

p42/p44-MAPK spielen ebenfalls eine wichtige Rolle im Prozess der Angiogenese. Sie verhindern die Apoptose von Zellen, kontrollieren die Proliferation von Endothelzellen und fördern die Expression von Wachstumsfaktoren, wie VEGF (Berra et al. 2000).

Die prolongierte Aktivierung von p42/p44-MAPK kann über Stunden andauern und scheint in Abhängigkeit vom Zelltyp für das Überleben der Zelle und die Aufrechterhaltung des differenzierten Zellzustandes oder aber für Zellwachstum und neoplastische Zelltransformation wichtig zu sein. So bewirkt die Aktivierung von p42/p44-MAPK z.B. die Differenzierung von Blutzellen, neuronalen Zellen und Skelettmuskelzellen. Andererseits sind diese Proteinkinasen auch in der Lage, Dedifferenzierung und Transformation von Zellen zu induzieren. Es konnte beispielsweise an Nierentubulus-Epithelzellen gezeigt werden, dass eine p42/p44-MAPK-Aktivierung zu einer Transformation in Myofibroblasten-ähnlichen Zellen mit ausgeprägten invasiven Eigenschaften führt (Schramek 2002).

In einer Vielzahl von Tumorentitäten, wie Mamma-, Bronchial-, Kolon- und Pankreaskarzinom, konnte eine gesteigerte Expression bzw. eine anhaltende Aktivierung der MAPK-Kaskade nachgewiesen werden.

Tsuboi et al. (2004) konnten die Überexpression von p42/p44-MAPK im hepatozellulären Karzinom nachweisen. Des Weiteren wurde eine enge Korrelation zwischen der p42/p44-MAPK-Expression und der Proliferationsaktivität im HCC festgestellt. Neben anderen werden p42/p44-MAPK als wesentliche intrazelluläre Effektorsysteme im Rahmen der Hepatokarzinogenese bewertet. So wird deren Inhibierung als eine Möglichkeit der HCC-Therapie verfolgt (Klein et al. 2006, Calvisi et al. 2007).

3. Zielstellung

Tumorerkrankungen sind gegenwärtig in den industrialisierten Ländern die zweithäufigste Todesursache, so dass die Forschung auf diesem Gebiet nach wie vor von sehr großer Bedeutung ist. Unter der Vielzahl der molekularen Strukturen, die im Fokus der Forschungsarbeiten liegen, befinden sich auch Thrombinrezeptoren vom Typ der Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PARs), die innerhalb der letzten Jahre auf diesem Gebiet zunehmend an Bedeutung gewonnen haben. Dabei gibt es bereits eine ganze Reihe von Daten für PAR₁, den Prototyp dieser Rezeptoren, die eine Beteiligung an der Entwicklung invasiver Eigenschaften von Tumorzellen belegen. Gegenwärtig wird dessen Funktion sehr intensiv in verschiedenen epithelialen Tumorentitäten untersucht.

Die eigene Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit einigen Jahren u.a. mit Untersuchungen zur Funktion der PARs im hepatozellulären Karzinom (HCC), einem der weltweit häufigsten Malignome, das aufgrund äußerst limitierter therapeutischer Möglichkeiten eine sehr schlechte Prognose aufweist. Deshalb ist die Erarbeitung neuer Therapieansätze ein dringendes Erfordernis. In vorangegangenen Arbeiten konnte die eigene Gruppe bereits zeigen, dass die Aktivierung von PAR₁ und PAR₄ zu einer Steigerung der migratorischen Kapazität von Zellen der permanenten humanen Leberkarzinomzelllinien HEP-3B und SK-HEP1 führt, so dass auf eine mögliche Wirkung dieser beiden PAR-Subtypen im Prozess der HCC-Progression geschlossen wurde. Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, mit Untersuchungen an Zellen einer Tumor-Primärkultur, die aus dem Gewebe eines chirurgisch entfernten HCC etabliert wurde, einen weiteren Beitrag zur Bestimmung der Funktion Proteinase-aktivierter Rezeptoren im hepatozellulären Karzinom zu leisten. Nach Ermittlung des Vorkommens der PAR-Typ-Thrombinrezeptoren sollte geklärt werden, ob die Thrombinrezeptoren PAR₁ und PAR₄ in HCC-Primärkulturzellen migratorische Effekte vermitteln und ob dabei p42/p44-MAPK involviert sind, ein Enzymsystem, dessen wesentliche Rolle in der Hepatokarzinogenese bereits bekannt war.

Um die Effekte von PAR₁ und PAR₄ selektiv zu erfassen, sollten neben Untersuchungen mit Thrombin solche unter Verwendung von PAR₁- und PAR₄-selektiven Agonisten sowie Antagonisten durchgeführt werden.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
- Agarose 2%	Life Technologies, Paisley, Schottland
- Ammoniumpersulfat (APS)	ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA
- AmnioMax TM -C100 Basal Medium (1x)	Gibco TM , Paisley, Schottland
- AmnioMax TM -C100 Supplement	Gibco TM , Paisley, Schottland
- AMV/Tfl 5x Reaction Buffer	Promega Corporation, Madison, USA
- AMV Reverse Transcriptase	Promega Corporation, Madison, USA
- Anti-p42/p44-MAPK, rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
- Anti-P-p42/p44-MAPK (E-4), mouse monoclonal IgG _{2a}	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
- Bacitracin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Beta-Actin-Primer	Gibco BRL Life Technologies
- Bromphenol Blue	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Buffer RLT, Lysis buffer	Quiagen GmbH, Hilden
- Buffer RPE, Wash buffer	Quiagen GmbH, Hilden
- Buffer RW1, Wash buffer	Quiagen GmbH, Hilden
- Centrifuge Tubes, 15ml	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Collagenase Type: CLS	Biochrom AG, Berlin
- Cryo Tube TM Vials Nunc TM	Brand Products, Roskilde, Dänemark
- DAKO® Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin, Clone MNF 116	DacoCytomation GmbH, Hamburg
- DAKO® Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, Clone 1A4	DacoCytomation GmbH, Hamburg
- DC Protein Assay: Reagent A, B, S	Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning

- Deoxycholic acid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- DNA Molecular Weight Marker XIV, 100 base pair ladder	Roche Diagnostics GmbH, Steinheim
- ECL™ Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont Buckinghamshire, UK
- Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Elektrophorese-Pipettenspitzen	Sorenson™, Bio Science Inc., Salt Lake City, USA
- Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Ethanol absolut	AppliChem GmbH, Darmstadt
- Filterpapier	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
- Flüssiger Stickstoff	Linde, Leuna
- Gel-Blotting-Papier, 300x600mm	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
- Gewebekulturflaschen Cellstar®, 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Gewebekulturplatten Cellstar®, 6-well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Giemsa-Farbstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Glycerin, wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Glycin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- goat-anti-mouse IgG, HRP conjugated	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
- goat-anti-rabbit IgG, HRP conjugated	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
- Handschuhe Gentle Skin® classic	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden
- Humanes α -Thrombin	Kordia, Life Science, Leiden, Niederlande
- Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Isotone Lösung ISOTON® II	Beckman Coulter (Euro Diagnostics) GmbH, Krefeld
- Kodak Biomax MR Film, Scientific Imaging Film, 13x18cm	Eastman Kodak Company, Rochester, USA

- Kollagen, rat tail, 0,05%	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Kryoröhrchen	Nalgene, Rochester, USA
- Küvetten, 10x4x45mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- Leupeptin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
- 2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Microtube Reagiergefäße 1,5ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Mitomycin	Calbiochem, San Diego, USA
- Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Natrium-Fluorid	Merck KGaA, Darmstadt
- Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
- Natrium-Orthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Objektträger	Menzel GmbH & Co KG , Braunschweig
- PAR ₁ -Primer	Gibco BRL Life Technologies
- PAR ₃ -Primer	Gibco BRL Life Technologies
- PAR ₄ -Primer	Gibco BRL Life Technologies
- PBS-Dulbecco (1x)	Biochrom AG, Berlin
- Pepstatin A	Merck KGaA, Darmstadt
- PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Polycarbonate membranes, 8µm pore, 25x80mm	Neuro Probe Inc., Gaithersburg MD, USA
- Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range (Marker)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning
- ProteinauftragsPuffer Roti®-Load 1 (4-fach-Konz.)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- QIAshredder Mini Column	Quiagen GmbH, Hilden
- QIAshredder™ (250)-Kit	Quiagen GmbH, Hilden
- RNase-free Water	Quiagen GmbH, Hilden
- RNeasy Mini Column	Quiagen GmbH, Hilden
- Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- RPMI-1640-Medium (1x)	Biochrom AG, Berlin

- Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- SDS ultra pure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Sterilium Händedesinfektionsmittel	Bode Chemie Hamburg
- SybrGreen	Rockland, ME, USA
- Temed p.a. (99%)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Tfl DNA Polymerase	Promega Corporation, Madison, USA
- Trans-Blot® Transfer Medium	Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning
- Trasylol® 500 000KIE (Wirkstoff: Aprotinin)	Bayer Vital, Leverkusen
- Tris Ultra Qualität	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Tris-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Triton® x-100	Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg
- Trypsin (1:250)	Biochrom AG, Berlin
- Trypsin-EDTA Solution (0,05% / 0,02%) in PBS	Biochrom AG, Berlin
- Tween 20®	ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA
- Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

4.1.2. Rezeptoragonisten und -antagonisten

PAR-aktivierende Peptide (PAR-AP):

Kauf 53:	TFLLRN-NH ₂	selektiver PAR ₁ -Agonist / PAR ₁ -AP
Kauf 41:	AYPGKF-NH ₂	selektiver PAR ₄ -Agonist / PAR ₄ -AP

Die Peptide wurden von Dr. R. Kaufmann (Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, FSU Jena) in Zusammenarbeit mit Dr. Henklein (Institut für Biochemie, Charité, Berlin) mittels Festphasensynthese hergestellt.

PAR-inhibierende Peptide:

SCH79797:	PAR ₁ -selektiver Antagonist Tocris Bioscience, Ellisville, Missouri, USA
-----------	---

trans-cinnamoyl-YPGKF-NH₂ : PAR₄-selektiver Antagonist
Peptides International, Louisville, Kentucky, USA

4.1.3. MEK-(MAPK-Kinase)-Inhibitoren

PD98059: Calbiochem®, Merck KgaA, Darmstadt
SL327: Calbiochem®, Merck KgaA, Darmstadt

4.1.4. Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Agarose-Gel (2%ig): 20g/l Agarose, (SybrGreen Verdünnung 1:10 000)
in TAE-Puffer

APS-Lösung: 100g/l APS in Aqua dest.

Blocklösung (Blotto): 1g/l BSA und 10g/l Milchpulver in TBS-T-
Pufferlösung

BSA-Lösung: 1g/l BSA in Lysispuffer

Einfriermedium: Amniomax+Supplement (90Vol%), DMSO
(10Vol%)

Giemsa-Färbelösung: 100mg Giemsa Farbstoff ad 100ml Methanol

Lysispuffer: 5g/l Deoxycholat, 1g/l SDS, 10ml/l Triton 100
in PBS

PBS-Puffer: 8,77g/l NaCl, 1,29g/l NaH₂PO₄,
0,235g/l NaH₂PO₄H₂O in 1l Aqua dest. gelöst

ProbenPuffer für PCR-Agarosegele: 0,05% Bromphenolblau, 50% Glycerin,
0,2% SDS

SDS-LaufPuffer:	14,4g/l Glycin, 1g/l SDS, 3,03g/l Tris Ultra in Aqua dest.
SDS-Lösung:	100g/l SDS in Aqua dest.
SDS-PAGE-Sammelgel:	4% Acrylamid, 0,05% APS, 0,1% SDS, 0,1% Temed, 62,5mM Tris-HCl, pH 6,8
SDS-PAGE-Trenngel:	10% Acrylamid, 0,05% APS, 0,1% SDS, 0,5% Temed, 375mM Tris-HCl, pH 8,8
Stripping-Puffer:	100mM 2-Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5mM Tris-HCl, pH 6,7 in Aqua dest.
TAE-Puffer:	0,001M EDTA, 0,114Vol% Eisessig, 0,04M Tris Ultra
TBS-Pufferlösung:	150mM NaCl, 10mM Tris-HCl
TBS-T-Pufferlösung:	150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 0,05% Tween
Transferpuffer:	192mM Glycin, 20Vol% Methanol, 25mM Tris Ultra
Tris-HCl-Puffer (0,5M):	181,7g Tris Ultra in Aqua dest. mit 1M HCl auf pH 6,8 eingestellt
Tris-HCL-Puffer (1,5M):	60,6g Tris Ultra in Aqua dest. mit 1M HCl auf pH 8,8 eingestellt
Tris-Puffer (pH 7,6):	21,9g NaCl, 17,1g Tris-HCl, 2,25g Tris-Base, 2,5ml Tween auf 2,5l mit Aqua dest. aufgefüllt
Zellkulturmedium:	AmnioMax TM -C100 Basal Medium + AmnioMax TM -C100 Supplement

4.1.5. Geräte

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
- -20°C Kühlschrank: Premium no-frost	Liebherr
- -4°C Kühlschrank, Modell S 8140S	Bomann
- -86°C Kühlschrank: -86°C FREEZER, Modell 917	Forma Scientific, Inc., Ohio, USA
- Abflamngerät flammy S	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen
- Autoclave-Steam Sterilizer 2540 EL	Tuttnauer Europe
- Auto-Pipetierhilfe Pipetus®-akku	Hirschmann-Laborgeräte
- Brutschrank BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau
- Coulter Z2, Particle count & size analyzer	Coulter Electronics LTD, England
- Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
- Filmkassette X-omatic cassette	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
- Gefriercontainer	Nalgene, Rochester, USA
- Magnetrührer IKAMAG® REO	IKA®-Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen i. Br.
- Mikroskop Axiolab	Carl Zeiss Analytik Jena GmbH, Jena
- Mikroskop Invers Durchlichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Analytik Jena GmbH, Jena
- Mini Centrifuge C-1200	National Labnet Co., Woodridge, USA
- Mini PROTEAN 3 Electrophoresis Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning
- Minishaker MS1	IKA® Works, Inc., Wilmington, USA
- Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning
- Neuro Probe 48-well Chemotaxiskammer (AP 48)	Neuro Probe Inc., Gaithersburg MD, USA
- PCR-Elektrophoresekammer, Modell Nr. BM 100	Boehringer Ingelheim Bioproducts-Partnership, Heidelberg
- PCR-Stromversorgungsgerät	Boehringer Ingelheim Bioproducts-Partnership, Heidelberg
- Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ-Research, NC., Massachusetts, USA

- pH-Meter 320	Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
- Pippetierhilfe 2/10/20/100/200/1000µl	ABIMED, Langenfeld
- Schütteleinrichtung	Unimax, Heidolph
- Spekol UV-VIS	Carl Zeiss Analytik Jena GmbH, Jena
- Stickstoffbehälter MVE XC 34/18	MVE, Inc., Burnsville, USA
- Thermoblock	Boekel Scientific, Emersacker
- Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Osterode
- Transilluminator Image Master® VDS	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
- Waage AC 211S	Sartorius AG, Göttingen
- Waage LC 621S	Sartorius AG, Göttingen
- Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Osterode

4.2. Methoden

4.2.1. Die HCC-Primärkultur PHC1

Die Untersuchungen wurden an der HCC-Primärkultur PHC1 durchgeführt. Diese Primärkultur war im Forschungslabor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie aus dem HCC-Gewebe eines Patienten etabliert worden. Dabei handelte es sich um ein hepatozelluläres Karzinom vom gemischt trabekulär-pseudoglandulären Wachstumstyp mit einer mäßiggradigen Differenzierung (G2), wobei keine sklerosierende Stromareaktion zu erkennen war und das vorbestehende Leberparenchym eine inkomplette Leberzirrhose zeigte.

Es wurden ausschließlich Zellproben der 1.-5. Passage für die Untersuchungen verwendet. Diese Zellen waren hinsichtlich ihres epithelialen Ursprungs immunzytochemisch mit Hilfe eines Cytokeratin-Antikörpers (MNF 116, Fa. DAKOCytomation), sowie zum Ausschluss einer in Tumorzellprimärkulturen häufig vorkommenden Myofibroblasten-Kontamination mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen glattes Muskelaktin gerichtet ist (1A4, Fa. DAKOCytomation), charakterisiert.

4.2.1.1. Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung erfolgte unter konstanten Bedingungen (Temperatur 37°C, relative Luftfeuchte 95%, CO₂-Gehalt 5,0Vol%) im Brutschrank. Als Zellkulturmedium wurde

Amniomax+Supplement verwendet. Der Mediumwechsel erfolgte routinemäßig alle zwei bis drei Tage. Sobald ein konfluenter Zellrasen zu beobachten war, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden die Zellen mit 4ml PBS gewaschen und anschließend mit 1ml Trypsin-EDTA 3min im Brutschrank inkubiert. Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen von ihrer Unterlage gelöst, in PBS aufgenommen und 5min bei 900U/min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes und Resuspension des Zellpelletts wurde die Zellsuspension in Amniomax+Supplement-Medium aufgenommen und in neue Gewebekulturflaschen bzw. Gewebekulturplatten (6-well-Platten) ausgesät.

4.2.1.2. Einfrieren der Zellen

Um die Zellen über einen längeren Zeitraum aufbewahren zu können, wurden diese in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die aus den Gewebekulturflaschen abgelösten Zellen wurden nach Zentrifugation in Amniomax+Supplement (10% DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen pipettiert. Diese wurden über Nacht in einem speziellen Gefriercontainer im Tiefkühlschrank bei -80°C eingefroren und am Folgetag zur Langzeitlagerung in Flüssigstickstoff überführt.

4.2.1.3. Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der in Flüssigstickstoff tiefgefrorenen Zellen wurden diese in einem 37°C Wasserbad rasch erwärmt und mit 4ml Amniomax+Supplement-Medium in 50ml-Gewebekulturflaschen inkubiert. Nach Anheften der Zellen am Boden der Kulturflasche wurde das DMSO durch zweimaliges Waschen mit 4ml PBS entfernt. Die weitere Kultivierung erfolgte wiederum in Amniomax+Supplement-Medium.

4.2.2. Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des Zellzählgerätes Coulter Z2. Im Falle einer Verwendung der Zellen für Experimente wurde zusätzlich deren Vitalität überprüft. Dies erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zellzählkammer, wobei an einem Aliquot der Zellsuspension, das mittels Trypanblau gefärbt wurde, das Verhältnis lebende/tote Zellen durch Auszählen am Mikroskop ermittelt wurde. Tote Zellen waren tiefblau gefärbt (Trypanblau kann in die Zelle eindringen, da die Zellmembran defekt ist) und die lebenden Zellen waren als hell durchscheinend zu erkennen (Trypanblau kann nicht in die Zelle eindringen, da die Zellmembran intakt ist), so dass eine

Unterscheidung relativ einfach war. Für die Experimente wurden ausschließlich Zellsuspensionen mit einem Anteil lebender Zellen von $\geq 95\%$ verwendet.

4.2.3. Gesamt-RNA-Isolation

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus den Leberzellkarzinomzellen wurde der RNeasy®-Mini-Kit (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet und entsprechend dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Nach erfolgter Isolation der Gesamt-RNA wurde deren Konzentration mit Hilfe des Spekol UV-VIS bei einer Wellenlänge von 260nm spektrophotometrisch ermittelt und jeweils 50ng RNA zur weiteren Verarbeitung eingesetzt.

4.2.4. Polymerasekettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese

Die Polymerasekettenreaktion stellt ein von Mullis entwickeltes Verfahren zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen dar, welches sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität auszeichnet (Mullis et al. 1986). Ein DNA-Doppelstrang wird durch Erhöhen der Temperatur auf 92 bis 95°C denaturiert und in Einzelstränge gespalten. Nach raschem Abkühlen auf 50°C werden zwei den Einzelsträngen komplementäre Oligonukleotide als Primer zugesetzt. Durch Zugabe einer DNA-Polymerase werden die beiden Einzelstränge nun zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert. Die entstandenen Reaktionsprodukte dienen im Weiteren selbst als Matrize, so dass eine große Menge Amplifikate erzeugt werden kann.

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten RT-PCR-Untersuchungen wurde das Access RT-PCR System der Fa. Promega verwendet. Durch ein optimiertes Puffersystem und der Kombination der AMV-Reversen Transkriptase mit der Tfl-DNA-Polymerase bietet dieses System den Vorteil, in einem Reaktionsansatz die RNA in die komplementäre DNA umzuschreiben sowie die Hybridisierung des Komplementärstranges an der cDNA und deren Amplifizierung durchzuführen. Zudem besitzt diese Methode eine hohe Sensitivität und vermeidet die Möglichkeit von Kontaminationen durch wiederholtes Öffnen der Reaktionsgefäße, da eine Zugabe weiterer Reagenzien während der Transkriptionen und den Amplifizierungen nicht erforderlich ist.

Folgende Primer wurden verwendet:

PAR₁: sense: 5' - TTC AGT CTG TGC GGC CCG CTG TT - 3'
anti-sense: 5' - CCA GGT GCA GCA TGT ACA CCA CC - 3'

PAR₃: sense: 5' - TTC CTC ACC TGC ATC AG - 3'
anti-sense: 5' - ACT GGG TCG AAG CAA CTA TT - 3'

PAR₄: sense: 5' - GGT GCC CGC CCT CTA TGG - 3'
anti-sense: 5' - TCA CGA GGT TCA TCA GCA - 3'

Als interne Kontrolle diente die Amplifizierung eines β -Aktinfragmentes.

Folgende Primer wurden verwendet:

β -Aktin: sense: 5' - CGG GAA ATC GTC CGT GAC AT - 3'
anti-sense: 5' - GAA CTT TGG GGG ATG CTC GC - 3'

Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte mittels Gel-Elektrophorese (Agarose-Gel 2%ig, SybrGreen, Verdünnung 1:10000). Es wurden 7 μ l der erhaltenen PCR-Proben mit 1 μ l Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit TAE-Puffer (1h bei 100V). Die Visualisierung der PCR-Fragmente (396bp für PAR₁, 513bp für PAR₃, 121bp für PAR₄, 712bp für β -Aktin) wurde mittels UV-Transillumination vorgenommen.

4.2.5. Herstellung der Zelllysate

Für die Western-Blot-Experimente zur Untersuchung der p42/p44-MAPK-Aktivierung wurden Zelllysate verwendet. Bei diesen Experimenten erfolgte die Aussaat von 2×10^5 Zellen pro Well einer 6-well-Platte unter Zugabe von jeweils 2ml Amniomax+Supplement-Medium mit anschließender Inkubation im Brutschrank bis zum Erreichen einer ca. 80%igen Konfluenz (nach ca. 48h Kultivierung). Nach Waschen sowie nachfolgender Inkubation mit RPMI-1640-Medium (ohne FKS) für 17h erfolgte die Behandlung der Zellen mit den jeweiligen Stimuli [im Falle der Kontrollen wurde das entsprechende Volumen Zellkulturmedium (ohne FKS) zugesetzt]. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die 6-well-Platte auf Eis gebracht, das Medium abgesaugt und die Zellen mit je 1ml PBS [plus Zusatz von Proteinaseinhibitoren: Aprotinin (EK 10 μ g/ml), Leupeptin (EK 2 μ g/ml), NaF (EK 1mM), Na₃VO₄ (EK 1mM),

Pepstatin (EK 1µg/ml) sowie PMSF (EK 100µg/ml)] gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und je 80µl Lysispuffer mit Proteinaseinhibitoren zugegeben. Nach Abschaben der Zellen mit einem Zellschaber wurde das gewonnene Lysat in Microtube-Reaktionsgefäße überführt, mit dem Minishaker intensiv gemischt, für 10min auf Eis gebracht und anschließend 20min bei 4°C und 13000U/min zentrifugiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Überstand mit Proteinauftrags-Puffer 1:4 gemischt, 2min gekocht und sofort weiterverarbeitet oder für die spätere Verarbeitung bei -20°C gelagert.

4.2.6. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde das Proteinbestimmungssystem DC Protein-Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning) verwendet. Bei dieser Methode führen zwei Schritte zur Farbentwicklung, die Reaktion zwischen Kupfer in einem alkalischen Medium und nachfolgend die Reduktion von Folin's Reagens durch die Kupfer-behandelten Proteine. Durch die Reduktion entstandene reduzierte Folin-Spezies haben eine charakteristische blaue Farbe mit einem Absorptionsmaximum von 750nm, wobei die Intensität der Farbreaktion vom Gehalt an den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan abhängig ist (Lowry et al. 1951, Peterson 1979). Mit Hilfe einer Bezugskurve, welche mit BSA-Lösungen definierter Konzentration erstellt wurde, erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration. Die Proben wurden photometrisch mit Hilfe des Spekol UV-VIS (Carl Zeiss Analytik Jena GmbH, Jena) bei einer Wellenlänge von 750nm gemessen und anschließend durch Zugabe von Aqua dest. auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt.

4.2.7. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE erfolgte die Auftrennung der Proben entsprechend ihres Molekulargewichtes. Dazu wurde ein 10%iges Trenngel mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet. Die Proben sowie 5µl Molekulargewichtsmarker wurden in 10er Kamm-taschen aufgetragen und es erfolgte die Auftrennung der Proteine in einer Bio-Rad Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (0,1% SDS) bei 150/200V in ca. 45 bis 60min.

4.2.8. Western Blotting

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels Western Blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde ein Mini Trans Blot Electrophoretic

Transfer Cell-System der Fa. Bio-Rad verwendet. Die Proteine wurden im Sandwich-Verfahren (Fiberpad – Filterpapier – Gel – Nitrocellulosemembran – Filterpapier – Fiberpad) in der mit Transferpuffer (4°C) gefüllten Transblot-Kammer (100V, 30min) geblottet. Ein in die Kammer eingehängter Eiscontainer und ein Magnetrührer sorgten für die notwendige Kühlung bzw. die kontinuierliche Zirkulation während des gesamten Blotvorganges. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran erfolgte in Blotto bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde die Membran 60min bei Raumtemperatur mit einem monoklonalen anti-P-p42/p44-MAPK-Antikörper (verd.: 1:500 in Blotto) inkubiert, mit TBS-T gespült und bei Raumtemperatur 45min mit einem HRP-konjugierten goat-anti-mouse-IgG (verd.: 1:500 in Blotto) inkubiert. Die Membran wurde dann in TBS-T gewaschen, in TBS überführt und 1min mit ECL Plus-Lösungen benetzt.

Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von Biomax MR-Filmen, wobei die Chemolumineszenz genutzt wird: unter alkalischen Bedingungen bewirkt die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase bei Anwesenheit von H₂O₂ die Oxidation von Luminol, was zu einer Lichtemission und damit zur Schwärzung des Filmes an definierten Stellen führt.

4.2.9. Membran-Stripping und anti-p42/p44-MAPK-Blotting

Um die gleichmäßige Beladung der Probenspuren mit p42/p44-MAPK-Protein zu überprüfen, erfolgte im Anschluss an die Visualisierung der Ergebnisse ein Membranstripping nach der Standardvorschrift von Amersham Pharmacia Biotech.

Zunächst wurde durch Waschen mit TBS-T das ECL-Reagenz von der Membran entfernt und diese anschließend 30min bei 50°C in Stripping-Puffer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (je 10min in TBS-T bei Raumtemperatur) wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Blotto inkubiert. Dann erfolgte die Behandlung mit einem polyklonalen anti-p42/p44-MAPK-Antikörper (verd.: 1:1000 in Blotto) sowie anschließend einem HRP-konjugierten goat-anti-rabbit-IgG (verd.: 1:1000 in Blotto). Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte wie unter Pkt. 4.2.8. beschrieben.

4.2.10. Untersuchungen zur chemotaktischen Migration

Chemotaxis bezeichnet die gerichtete Migration von Zellen zu Orten mit höheren Konzentrationen eines chemischen Stoffes, ein Verhalten, welches alle beweglichen Zellen aufweisen (Caterina und Devreotes 1991).

Um die chemotaktische Migration an humanen Leberzellkarzinomzellen zu bestimmen, wurde eine 48-well Chemotaxis-Kammer (Neuro Probe Inc., Gaithersburg MD, USA) verwendet. Im oberen Teil des aus zwei Kammerteilen bestehenden Systems befindet sich eine definierte Anzahl Zellen, im unteren der chemotaktische Stimulus. Zwischen den beiden Teilen ist ein Kollagen-beschichteter Polycarbonatfilter eingelegt. Es werden diejenigen Zellen erfasst, welche durch die Kollagen-beschichtete Membranbarriere migrieren.

In den Versuchen wurde ein Polycarbonatfilter der Porengröße 8µm verwendet, welcher über Nacht bei 4°C im Kühlschrank mit Kollagen beschichtet wurde. Die HCC-Primärkulturzellen wurden 17h in RPMI-1640-Leermedium kultiviert und anschließend eine Zellsuspension hergestellt. Danach wurden 27µl RPMI-1640-Medium (plus dem jeweiligen chemotaktischen Stimulus) pro well des unteren Kammerteils pipettiert. Die Kollagen-beschichtete Membran wurde aufgelegt, der obere Teil aufgesetzt und in jedes well 51µl Zellsuspension (30min Vorinkubation der Zellen mit dem jeweiligen p42/p44-MAPK-Inhibitor bzw. PAR-Antagonisten) pipettiert. Nach 48h Inkubation im Brutschrank bei 37°C erfolgte die Fixierung der an der Membran anhaftenden Zellen mit 96%igem Ethanol. Anschließend wurden die Zellen mit Aqua dest. gespült und 3min mit Giemsa-Lösung gefärbt. Die Membran wurde nochmals mit Aqua dest. gespült und die an der Oberseite der Membran anhaftenden Zellen mit Hilfe eines Wattestäbchens entfernt. Nach Trocknen der Membran erfolgte die Zählung der durch die Membran gewanderten Zellen an der Membranunterseite mit Hilfe eines Mikroskops Axioplan (Carl Zeiss Analytik Jena GmbH, Jena), wobei jeweils alle Zellen eines Loches gezählt wurden.

4.2.11. Statistische Auswertung der Migrationsdaten

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms SPSS 13 (Windows computer program, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Es wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet, da die Daten nicht normalverteilt waren. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert <0,05 eingestuft.

5. Ergebnisse

5.1. Nachweis von PAR₁, PAR₃ und PAR₄ in Zellen der HCC-Primärkultur PHC1

Zum Nachweis der PAR-Typ Thrombinrezeptoren in der HCC-Primärkultur PHC1 wurde deren Vorkommen auf RNA-Ebene untersucht. Die aus den Zellen isolierte Gesamt-RNA wurde mittels AMV-Reverser Transkriptase in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und diese anschließend mittels PCR vervielfältigt.

Ein Fragment des ubiquitär vorkommenden Zytoskelettproteins β -Aktin wurde als interne methodische Kontrolle mitgeführt. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, die Visualisierung der DNA-Banden erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators.

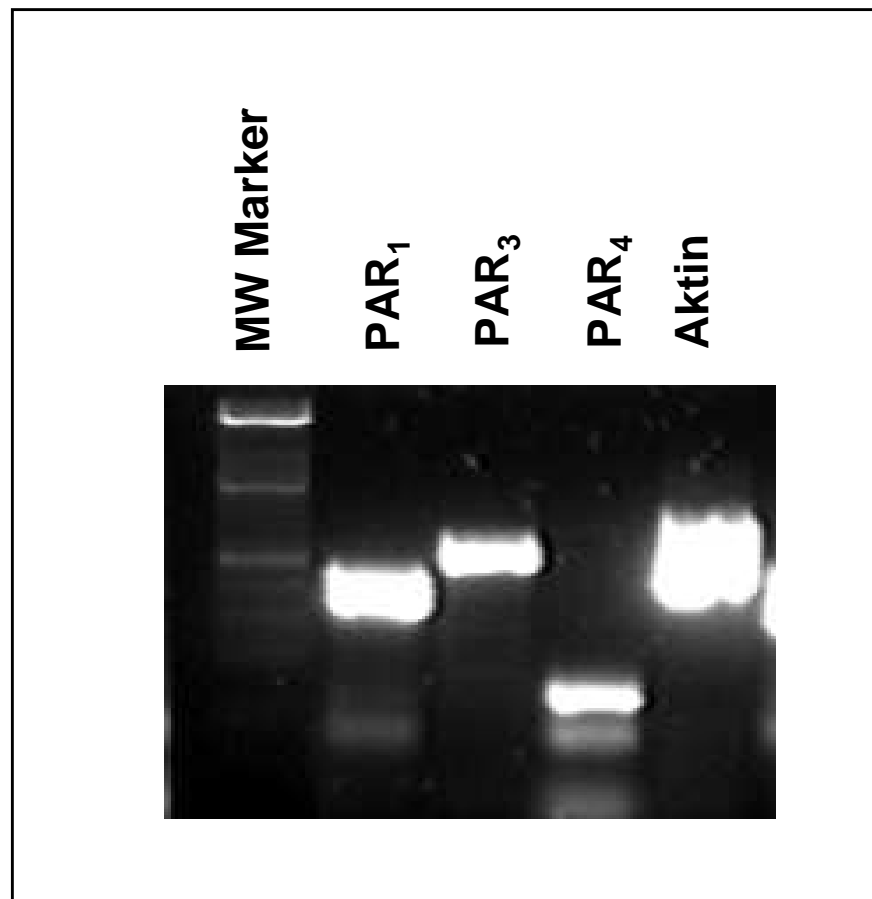


Abb. 6: Expression von PAR₁-, PAR₃-, PAR₄- und β -Aktin-RNA in PHC1-Zellen

Nach Präparation von Gesamt-RNA und cDNA-Synthese erfolgte die RT-PCR mit Hilfe spezifischer Primer für PAR₁, PAR₃, PAR₄ bzw. β -Aktin. Die Auftrennung der PCR-Produkte wurde mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese vorgenommen, die Visualisierung mit Hilfe eines Transilluminators. Die Darstellung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente. MW Marker: Molekulargewichtsmarker

Wie in Abbildung 6 dargestellt, konnten die drei PAR-Typ-Thrombinrezeptoren PAR₁, PAR₃ und PAR₄ auf RNA-Ebene in Zellen der HCC-Primärkultur PHC1 nachgewiesen werden. Die PCR-Produkte entsprachen den erwarteten Größen: 396bp für PAR₁, 513bp für PAR₃ und 121bp für PAR₄. Als interne Kontrolle der Integrität der verwendeten cDNAs wurde ein Fragment des ubiquitär vorkommenden beta-Aktins amplifiziert, das ebenfalls die erwartete Fragmentgröße (712bp) ergab (Abb. 6).

5.2. PAR₁ und PAR₄ vermitteln in PHC1-Zellen einen migratorischen Effekt

Um die Funktion der Proteinase-aktivierten Rezeptoren zu erfassen, wurden zunächst Untersuchungen auf zellulärer Ebene durchgeführt. Dabei erfolgte eine Beschränkung auf die Thrombinrezeptoren PAR₁ und PAR₄, da lediglich für diese beiden Rezeptoren gut charakterisierte selektive Agonisten sowie Antagonisten zur Verfügung stehen. Als zellulärer Parameter wurde die Zellmigration untersucht, wobei der endogene PAR-Agonist Thrombin, das selektiv PAR₁-aktivierende Peptid TFLLRN-NH₂, das selektiv PAR₄-aktivierende Peptid AYPGKF-NH₂ sowie der PAR₁-Antagonist SCH79797 und der PAR₄-Antagonist trans-cinnamoyl-YPGKF-NH₂ Verwendung fanden. In diesen Experimenten wurde die chemotaktische Wanderung der HCC-Primärkulturzellen durch eine Kollagen-beschichtete Polycarbonatmembran (Porendurchmesser 8,0µm) in einer modifizierten Boyden-Kammer charakterisiert. Nach 17h Kultivierung in serumfreiem RPMI-1640-Medium wurden die PHC1-Zellen mit Thrombin (1,0NIH-U/ml), dem PAR₁-AP TFLLRN-NH₂ (100µM) oder dem PAR₄-Agonisten AYPGKF-NH₂ (400µM) 48h stimuliert. Im Falle der Experimente, in denen die Rezeptorantagonisten verwendet wurden, erfolgte deren Vorinkubation 30min bevor Thrombin appliziert wurde.

Wie in Abbildung 7 dargestellt, führte die Applikation des endogenen PAR-Liganden Thrombin zu einer signifikanten Steigerung der Migration von PHC1-Zellen. Da Thrombin ein nicht-selektiver Aktivator der PAR-Typ Thrombinrezeptoren ist und deshalb diese Ergebnisse keine Aussage über die spezifische Beteiligung von PAR₁ und/oder PAR₄ erlauben, wurden weitere Untersuchungen mit PAR-Subtyp-selektiven Agonisten und Antagonisten durchgeführt. Sowohl eine PAR₁-AP- als auch eine PAR₄-AP-Stimulation führten zu einer signifikant erhöhten Migrationskapazität von PHC1-Zellen (Abb. 7). Um eine Beeinflussung der Effekte durch Zellproliferation auszuschließen, wurden Kontrollexperimente unter Verwendung des Proliferationshemmers Mitomycin durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass eine Vorbehandlung der PHC1-Zellen mit Mitomycin (10µM; 30min) keinen signifikanten

Einfluss auf den Effekt von Thrombin sowie von TFLLRN-NH₂ und AYPGKF-NH₂ auf die Migration von Zellen der Primärkultur PHC1 durch eine Kollagen-beschichtete Membranbarriere hat (Abb. 7).

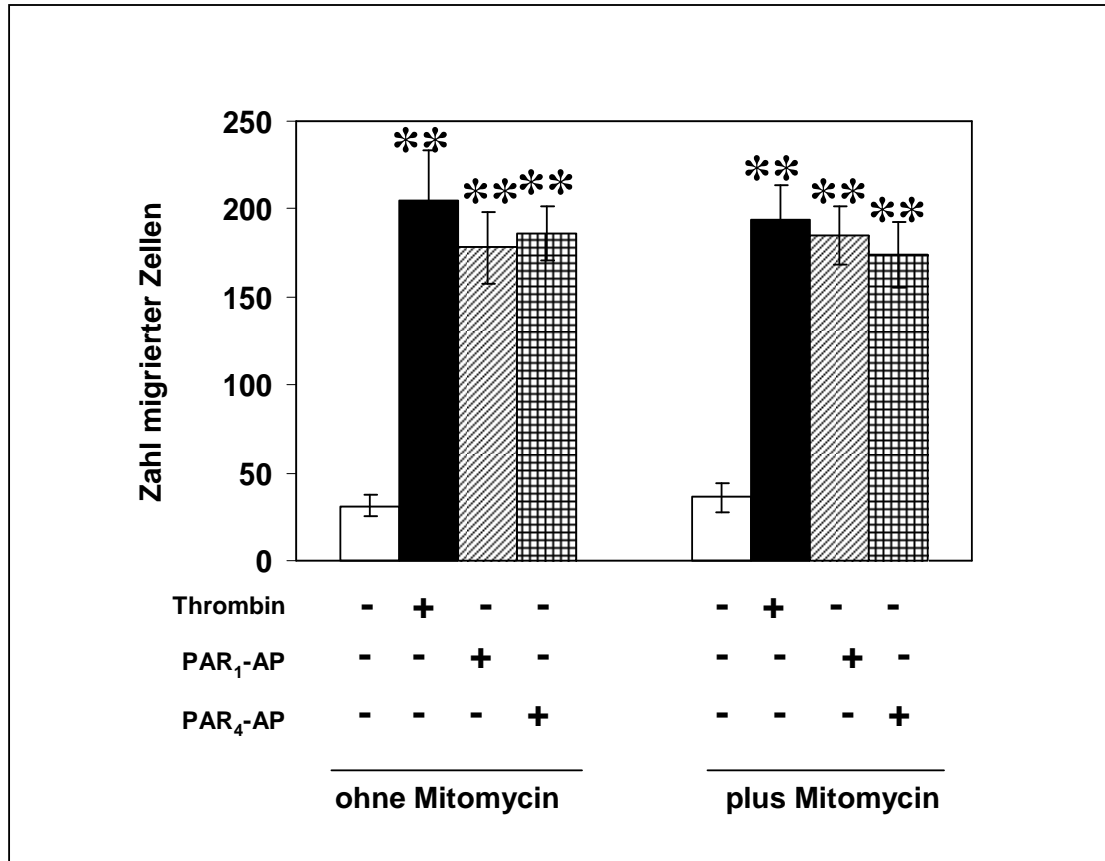


Abb. 7: Thrombin-, PAR₁-AP- und PAR₄-AP-induzierte Migration von PHC1-Zellen sowie der Effekt des Proliferationsinhibitors Mitomycin

Die Zellen wurden nach einer 17-stündigen Hungerphase in RPMI-1640-Medium 48h mit Thrombin (1,0NIH-U/ml), dem PAR₁-selektiven Agonisten TFLLRN-NH₂ (PAR₁-AP; 100μM) oder dem PAR₄-selektiven Agonisten AYPGKF-NH₂ (PAR₄-AP; 400μM) stimuliert. Mitomycin (10μM) wurde 30min vorinkubiert, bevor die Stimulation mit dem jeweiligen Agonisten erfolgte. Die durch die Kollagen-beschichtete Membran gewanderten Zellen wurden fixiert und mit Giemsa gefärbt, die Quantifizierung erfolgte durch Auszählen der Zellen am Mikroskop. Die Werte stellen Mittelwerte ± SD von jeweils 8 Einzelbestimmungen eines Experiments dar, das repräsentativ für 3 unabhängige Assays ist. **p-Wert <0,05 vs. nicht stimuliert (Mann-Whitney-U-Test).

In einem weiteren experimentellen Setup wurde der Effekt von PAR-Subtyp-selektiven Antagonisten auf die Thrombin-induzierte Migration von PHC1-Zellen untersucht. In Abbildung 8 ist ersichtlich, dass sowohl der PAR₁-Antagonist SCH79797 (10μM) als auch der PAR₄-Antagonist trans-cinnamoyl-YPGKF-NH₂ (10μM) den Migrationseffekt von Thrombin teilweise hemmten. Wie in Abbildung 8 weiter ersichtlich, führte auch

eine gleichzeitige Applikation des PAR₁- und des PAR₄-Antagonisten nicht zur vollständigen Hemmung des Effekts von Thrombin auf die migratorische Kapazität von PHC1-Zellen.

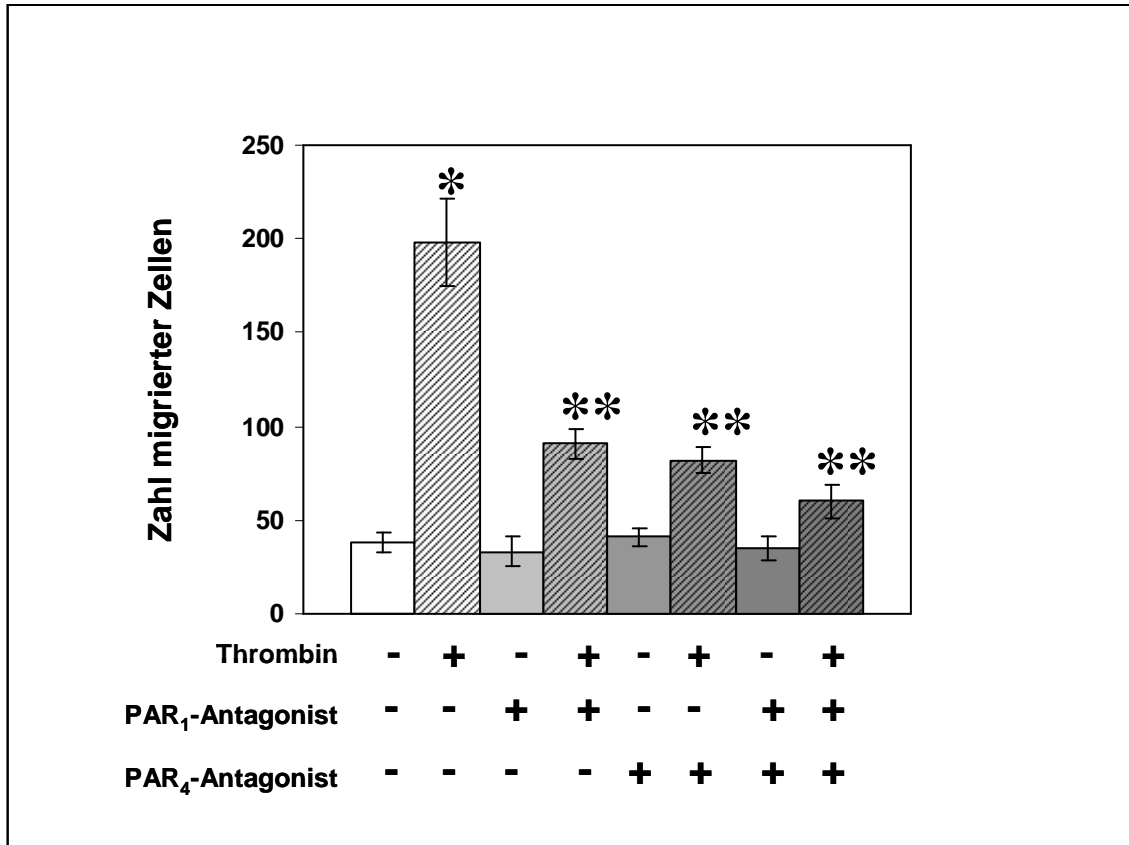


Abb. 8: Effekt des PAR₁-selektiven Antagonisten SCH79797 sowie des PAR₄-selektiven Antagonisten *trans*-cinnamoyl-YPGKF-NH₂ auf die Thrombin-induzierte Migration von PHC1-Zellen

Die Zellen wurden nach 17h in RPMI-1640-Medium 48h, wie angegeben, behandelt. Nach Fixierung und Giemsa-Färbung der durch die Membran gewanderten Zellen erfolgte deren Quantifizierung durch Auszählen am Mikroskop. Thrombin (1,0NIH-U/ml), PAR₁-Antagonist SCH79797 (10μM; Vorinkubation 30min), PAR₄-Antagonist *trans*-cinnamoyl-YPGKF-NH₂ (10μM; Vorinkubation 30 min).

Die Werte stellen Mittelwerte ± SD von jeweils 8 Einzelbestimmungen eines Experiments dar, das repräsentativ für 3 unabhängige Assays ist. *p-Wert <0,05 vs. nicht stimuliert und vs. Thrombin; **p-Wert <0,05 vs. nicht stimuliert, vs. PAR₁-Antagonist, vs. PAR₄-Antagonist, vs. PAR₁-Antagonist plus PAR₄-Antagonist (Mann-Whitney-U-Test).

5.3. MAPK-Inhibitoren hemmen den PAR₁- und PAR₄-vermittelten Effekt auf die Migration von PHC1-Zellen

Zur Charakterisierung der an den migratorischen Effekten von PAR₁ und PAR₄ beteiligten intrazellulären Signalweiterleitungssystemen wurde in einem ersten Schritt eine mögliche Beteiligung der p42/p44-MAPK untersucht, von denen eine wesentliche

Rolle im Rahmen der Hepatokarzinogenese bereits bekannt war (Ito et al. 1998). Es wurden zunächst Migrationsexperimente mit den selektiven MEK (MAPK-Kinase)-Inhibitoren PD98059 sowie SL327 durchgeführt. Diese für derartige Fragestellungen üblicherweise verwendeten Hemmstoffe bewirken eine MEK-Inhibierung, so dass es nachfolgend zur Hemmung der p42/p44-MAPK kommt, da diese nicht mehr durch MEK phosphoryliert werden können (Alessi et al. 1994, Dudley et al. 1995, Atkins et al. 1998).

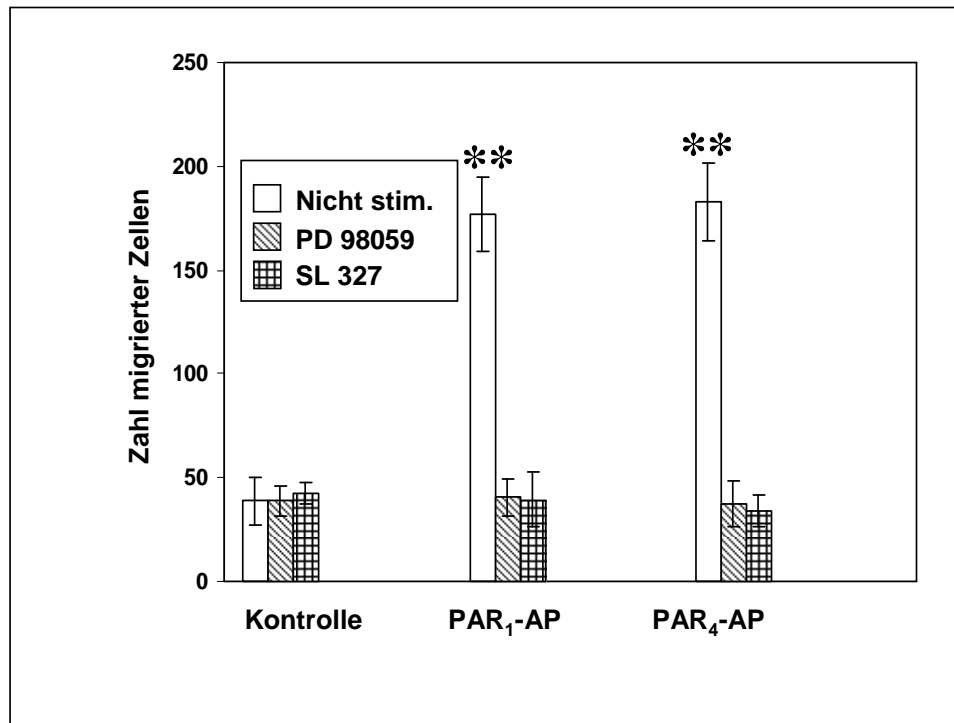


Abb. 9: Effekt von PD98059 und SL327 auf die PAR₁-AP- und PAR₄-AP-stimulierte Migration von PHC1-Zellen

Die Zellen wurden 48h mit PAR₁-AP TFLLRN-NH₂ (100μM) oder PAR₄-AP AYPGKF-NH₂ (400μM) stimuliert, die Vorinkubationszeit von PD98059 (10μM) bzw. SL327 (10μM) betrug jeweils 30min.

Die Werte stellen Mittelwerte ± SD von jeweils 8 Einzelbestimmungen eines Experiments dar, das repräsentativ für 3 unabhängige Assays ist. **p-Wert <0,05 vs. nicht stimuliert, vs. PD98059 bzw. vs. SL327 (Mann-Whitney-U-Test).

Wie in Abbildung 9 dargestellt, kam es nach einer Vorinkubation (30 min) der PHC1-Zellen mit PD98059 bzw. SL327 zu einer signifikanten Inhibierung des TFLLRN-NH₂- und des AYPGKF-NH₂-induzierten Migrationseffekts.

5.4. PAR₁ und PAR₄ vermitteln in PHC1-Zellen eine p42/p44-MAPK-Aktivierung

Da die Resultate der Untersuchungen mit den MEK-Inhibitoren PD98059 und SL327 auf eine Beteiligung von p42/p44-MAPK an der PAR₁- und PAR₄-geförderten

Migration von PHC1-Zellen hindeuteten, ging es nun darum nachzuweisen, dass PAR₁ und PAR₄ in diesen Zellen auch in der Lage sind, p42/p44-MAPK zu aktivieren. Da die Aktivierung von p42/p44-MAPK mit deren Phosphorylierung verbunden ist, wurde diese an PHC1-Zelllysaten mit Hilfe von Western Blotting und einem gegen phosphorylierte p42/p44-MAPK (P-p42/p44) gerichteten Antikörper untersucht. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen MAPK-Proteinbeladung der Probenspuren wurden die Membranen anschließend gestrippt und das p42/p44-Gesamtprotein mit Hilfe eines anti-p42/p44-Antikörpers bestimmt.

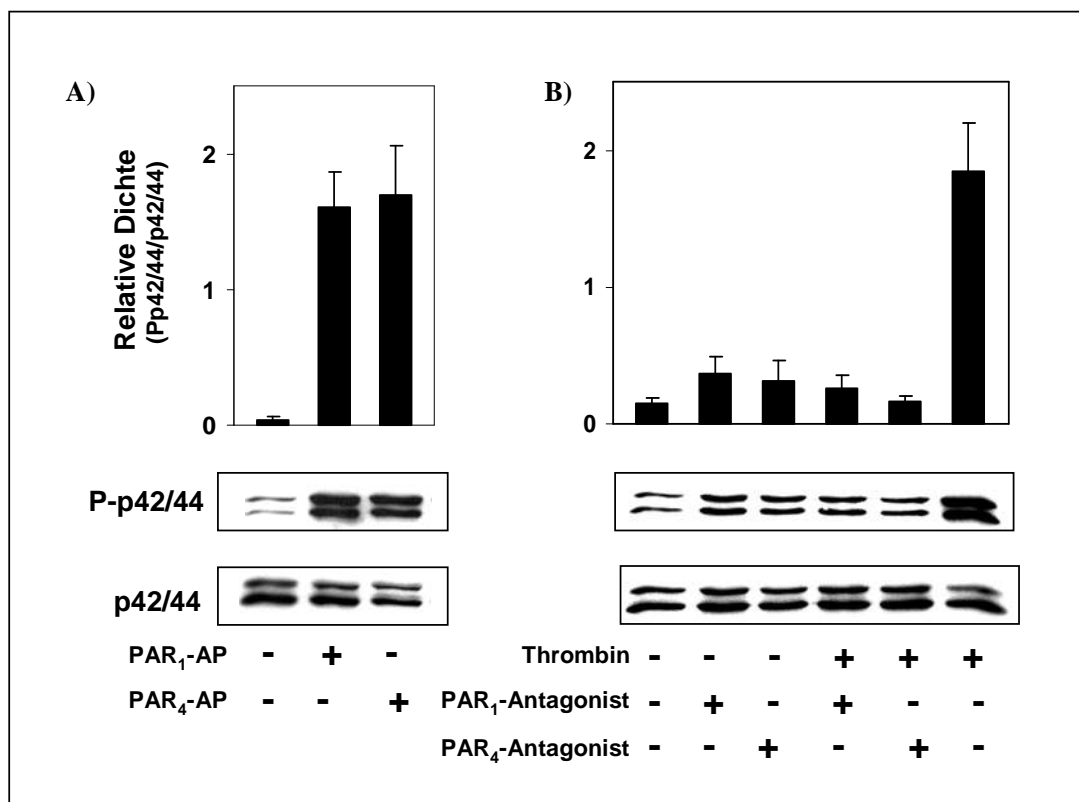


Abb. 10: A) Der PAR₁-selektive Agonist TFLLRN-NH₂ (PAR₁-AP; 10μM) und der PAR₄-selektive Agonist AYPGKF-NH₂ (PAR₄-AP; 400μM) induzieren in PHC1-Zellen eine Phosphorylierungsaktivierung von p42/p44-MAPK

B) Der PAR₁-Antagonist SCH79797 und der PAR₄-Antagonist trans-cinnamoyl-YPGKF-NH₂ hemmen den Effekt von Thrombin auf die Phosphorylierungsaktivierung von p42/p44-MAPK in PHC1-Zellen

PHC1-Zellen wurden 17h serumfrei kultiviert und anschließend 2min bei 37°C, wie angezeigt, stimuliert. Der PAR₁-selektive Antagonist SCH79797 (10μM) bzw. der PAR₄-selektive Antagonist trans-cinnamoyl-YPGKF-NH₂ (10μM) wurde jeweils 30min vorinkubiert. Nach Zelllyse, Elektrophorese und Western Blotting bzw. Stripping und Western Blotting wurden die Ergebnisse mittels Chemolumineszenz visualisiert und mit Hilfe eines densitometrischen Verfahrens (AIDA image analyzer v.3.22 program) quantifiziert. In den Histogrammen oberhalb der Blots sind normalisierte Daten (P-p42/p44 / p42/p44-Gesamtprotein) von 3 unabhängigen Experimenten ± SD dargestellt.

Sowohl Thrombin (Abb. 10 B) als auch der PAR₁-Agonist TFLLRN-NH₂ und der PAR₄-Agonist AYPGKF-NH₂ (Abb. 10 A) induzierten in PHC1-Zellen eine verstärkte Phosphorylierung und damit Aktivierung von p42/p44-MAPK. Dabei war dieser Effekt in seiner Höhe für alle drei Stimuli vergleichbar (ca. 6-fach im Vergleich zu nicht stimulierten PHC1-Zellen). Die Experimente mit den PAR-Antagonisten ergaben, dass Thrombin nach 30-minütiger Vorinkubation der Zellen sowohl mit dem PAR₁-Antagonisten SCH79797 als auch mit dem PAR₄-Antagonisten trans-cinnamoyl-YPGKF-NH₂ nicht mehr in der Lage war, eine im Vergleich zum Basislevel erhöhte Phosphorylierung und damit Aktivierung von p42/p44-MAPK zu induzieren (Abb. 10 B).

6. Diskussion

Das HCC gehört weltweit zu den häufigsten malignen Tumoren. Zudem kommt es in Gebieten wie Südostasien und Afrika endemisch vor und ist dort die häufigste krebsbedingte Todesursache. Weltweit nimmt das HCC bei steigender Inzidenz Rang drei in der tumorbedingten Todesursachenstatistik ein (Pisani et al. 1999, Parkin 2001). Da die Diagnosestellung häufig erst im fortgeschrittenen Stadium erfolgt, können die einzigen kurativen Maßnahmen, Tumoresektion und Lebertransplantation, oft nicht mehr erfolgreich durchgeführt werden. Zudem besteht die Gefahr eines Tumorrezidivs. Die bisherigen medikamentösen Therapiemöglichkeiten besitzen lediglich palliativen Charakter (Dietrich et al. 2003) und auch erste vielversprechende Ergebnisse mit dem Multikinase-Inhibitor Sorafenib bedürfen einer weiteren Evaluierung. Vor diesem Hintergrund ist eine intensive Forschung hinsichtlich der Entwicklung neuer erfolgversprechender Behandlungsmethoden dringend erforderlich.

Tumorstadium und -progression sind abhängig von verschiedensten intrazellulären Signalwegen. In der Hepatokarzinogenese kommt hierbei u.a. den p42/p44-MAPK eine wesentliche Bedeutung zu (Schmidt et al. 1997, Ito et al. 1998). MAPK sind unter anderem am physiologischen Zellwachstum, der Mitogenese und der Zelldifferenzierung beteiligt und spielen aber auch eine große Rolle bei der Transformation und der Migration maligner Zellen (Feng et al. 2001). Die Aufklärung MAPK-assoziiierter Signalwege sowie deren gezielte Beeinflussung ist gegenwärtig Inhalt zahlreicher Forschungen, dies mit dem Ziel der Entwicklung einer gerichteten molekularen Krebstherapie.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass die Aktivierung der Proteinase-aktivierten Rezeptoren PAR₁ und PAR₄ in der HCC-Primärkultur PHC1 die Migration der Tumorzellen durch eine Kollagen-beschichtete Membranbarriere stimuliert, wobei p42/p44-MAPK involviert sind.

6.1. Experimenteller Hintergrund und Auswahl des zellulären Modells

In bisherigen Arbeiten der eigenen Gruppe konnte bereits an Zellen der permanenten humanen Leberkarzinomzelllinien HEP-3B und SK-HEP1 nachgewiesen werden, dass die PAR-Typ-Thrombinrezeptoren PAR₁ und PAR₄ eine Beeinflussung der Migration dieser Zellen unter Beteiligung von p42/p44-MAPK vermitteln (Kaufmann et al. 2007). Damit ist eine Funktion von PAR₁/PAR₄ in der HCC-Progression zu vermuten.

Da sich Zellen permanenter Zelllinien im Verlaufe einer üblicherweise langen Kultivierungszeit mit häufigem Passagieren sehr oft in ihren Eigenschaften ganz wesentlich von ihren ursprünglichen im Tumorgewebe unterscheiden, ist die Aussagefähigkeit von Ergebnissen, die mit Untersuchungen an derartigen Zellen erarbeitet werden, relativ beschränkt. Dieser Nachteil lässt sich durch die Verwendung sog. Primärkulturen, die frisch aus Patienten-Tumorgewebe isoliert werden und nur wenige Passagen erfahren, erheblich verbessern.

Diesem wesentlichen Aspekt bei Arbeiten mit Tumorzellen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Untersuchungen zur Funktion von PAR₁ und PAR₄ an einer HCC-Primärkultur Rechnung getragen. Dabei handelte es sich um eine Primärkultur (PHC1), die aus einem chirurgisch-entfernten hepatozellulären Karzinom etabliert und deren Zellen mit Hilfe immunzytochemischer Methodik hinsichtlich ihrer epithelialen Herkunft charakterisiert wurden.

Zunächst konnte mit Hilfe von RT-PCR gezeigt werden, dass die Thrombinrezeptoren PAR₁ und PAR₄ in Zellen der HCC-Primärkultur PHC1 auf RNA-Ebene vorhanden waren. Damit war diese HCC-Primärkultur zur Untersuchung der PAR₁/PAR₄-Funktionalität geeignet.

PAR₁ und PAR₄ konnten bereits in Zellen verschiedener Tumorentitäten nachgewiesen werden (Even-Ram et al. 1998, Kaufmann et al. 1998, 1999, 2002, 2007, Darmoul et al. 2003). Für PAR₁ konnte zudem in Mamma- und Pankreastumoren eine Korrelation zwischen der Höhe der PAR₁-Expression und der metastatischen Kapazität dieser Tumore gezeigt werden (Even-Ram et al. 1998, Rudroff et al. 2002), so dass gegenwärtig eine Rolle von PAR₁ bei der Progression epithelialer Tumore diskutiert wird (Nierodzik et al. 1992, Fischer et al. 1995, Rudroff et al. 1998, Even-Ram et al. 2001, Yin et al. 2003, Heider et al. 2004, Bergmann et al. 2006, Salah et al. 2007).

6.2. PAR₁ und PAR₄ vermitteln einen migratorischen Effekt

Auf zellulärer Ebene wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Thrombin eine signifikante Erhöhung der Migration von Zellen der HCC-Primärkultur PHC1 durch eine Kollagen-beschichtete Membranbarriere induziert. Dabei sind die PAR-Typ-Thrombinrezeptoren PAR₁ und PAR₄ involviert. Dies wurde geschlussfolgert, da (I) sowohl der PAR₁-selektive Agonist TFLLRN-NH₂ und der PAR₄-selektive Agonist AYPGKF-NH₂ in der Lage waren, die Migration von PHC1-Zellen zu stimulieren, und (II) sowohl der PAR₁-selektive Antagonist SCH79797 als auch der PAR₄-selektive

Antagonist trans-cinnamoyl-YPGKF-NH₂ die Thrombin-stimulierte Migration der PHC1-Zellen hemmten. Da diese Hemmung jedoch nicht vollständig war, kann davon ausgegangen werden, dass noch andere, PAR₁- und PAR₄-unabhängige Mechanismen, an der Wirkung von Thrombin auf die Tumorzellmigration beteiligt sind. Eine Möglichkeit ist die Beteiligung von PAR₃, dessen Funktion bislang noch völlig unzureichend untersucht ist. Da für den murinen PAR₃ gezeigt wurde, dass dieser kein eigenes intrazelluläres Signal generiert, sondern bei der PAR₄-Aktivierung als Cofaktor agiert (Nakanishi-Matsui et al. 2000, Sambrano et al. 2001), ist auch für den humanen PAR₃ noch eine prinzipielle Klärung dieser Frage erforderlich. In nachfolgenden Arbeiten sollten deshalb mögliche Funktionen von PAR₃ in Leberkarzinomzellen untersucht werden. Dabei sollten insbesondere sowohl seit kurzem kommerziell verfügbare PAR₃ si-RNA als auch ein PAR₃-Antagonist, dessen Fähigkeit zur PAR₃-Hemmung bereits in anderen Zellsystemen charakterisiert wurde (Covic et al. 2002), Verwendung finden.

Es muss weiterhin berücksichtigt werden, dass Thrombin als Serinproteinase auch Rezeptor-unabhängige Prozesse durch katalytische Spaltung verschiedenster Proteine bzw. Enzyme auslösen kann. So konnte an Endothelzellen gezeigt werden, dass Thrombin durch derartige Mechanismen das Zellwachstum beeinflusst (Herbert et al. 1994). Die Möglichkeit einer Beteiligung Rezeptor-unabhängiger Effekte im Rahmen der Thrombin-induzierten Migration von HCC-Zellen sollte ebenfalls in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Um Effekte durch Zellproliferation, die nach einer Inkubationszeit von 48h denkbar waren und zu einer Verfälschung der Migrationsdaten geführt hätten, ausschließen zu können, wurden analoge Kontrollexperimente mit dem Proliferationsinhibitor Mitomycin durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass eine Hemmung der Proliferation durch Mitomycin keinen signifikanten Einfluss auf die Thrombin-stimulierte Migration in PHC1-Zellen hatte. Daher konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen der Einfluss von Proliferationseffekten ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergänzen die vorangegangenen Untersuchungen an permanenten Leberkarzinomzelllinien (Kaufmann et al. 2007) und stützen das Konzept einer Funktion von PAR₁ und PAR₄ bei der Regulation der Thrombin-geförderten Migration von HCC-Tumorzellen. Da für PAR₁ auch an Zellen anderer Tumorentitäten wie Kolon-, Nieren- und Pankreaskarzinom (Even-Ram et al. 1998, 2001, Kaufmann et al. 2002, Shi et al. 2004, Boire et al. 2005, Bergmann et al. 2006)

eine Stimulation der Migration nachgewiesen werden konnte, ist eine allgemeine Bedeutung Proteinase-aktivierter Rezeptoren bei der Progression epithelialer Tumore zu vermuten.

6.3. Der PAR₁- und der PAR₄- vermittelte Effekt auf die Migration von PHC1-Zellen ist MAPK-abhängig

In den vorangegangenen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe wurden p42/p44-MAPK bereits als Mediatoren im motogenen Signaling von PAR₁ und PAR₄ in Zellen der permanenten Leberkarzinomzelllinien HEP-3B und SK-HEP1 charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun zunächst gezeigt, dass p42/p44-MAPK auch in das motogene Signaling von PAR₁ und PAR₄ in Zellen einer HCC-Primärkultur involviert sind. Dazu wurden Migrationsuntersuchungen mit den selektiven MEK-Inhibitoren PD98059 sowie SL327 durchgeführt. Die Inhibitoren PD98059 und SL327 führen zur Hemmung von MEK. Nachfolgend kommt es zur Hemmung der p42/p44 MAPK, da diese nicht mehr durch MEK phosphoryliert werden können (Alessi et al. 1995, Dudley et al. 1995, Atkins et al. 1998). Eine Vorinkubation von PHC1-Zellen mit PD98059 bzw. SL327 führte zu einer signifikanten Hemmung sowohl des migratorischen Effekts des PAR₁-selektiven Agonisten TFLLRN-NH₂ als auch des selektiven PAR₄-Agonisten AYPGKF-NH₂. Diese Ergebnisse zeigen, dass p42/p44-MAPK eine wesentliche Funktion in der PAR₁- sowie PAR₄-stimulierten Migration von HCC-Zellen besitzen.

6.4. PAR₁ und PAR₄ vermitteln in PHC1-Zellen eine p42/p44-MAPK-Aktivierung

Die Ergebnisse der Experimente zur p42/p44-MAPK-Inhibierung auf zellulärer Ebene deuteten auf eine Rolle von p42/44-MAPK im PAR₁/PAR₄-Signaling hin. Deshalb ging es nun darum zu zeigen, dass PAR₁ und PAR₄ auch tatsächlich in der Lage sind, eine Aktivierung dieser Enzymsysteme zu vermitteln.

Die Untersuchungen ergaben, dass Thrombin in PHC1-Zellen eine Phosphorylierung und damit Aktivierung von p42/p44-MAPK über eine Wechselwirkung mit PAR₁ und PAR₄ induziert. Dies kann aus folgenden Befunden abgeleitet werden: (I) sowohl der endogene PAR-Ligand Thrombin als auch der selektive PAR₁-Agonist TFLLRN-NH₂ und der selektive PAR₄-Agonist AYPGKF-NH₂ induzierten eine p42/p44-MAPK-Aktivierung und (II) der PAR₁-selektive Antagonist SCH79797 (Ahn et al. 2000) sowie der PAR₄-selektive Antagonist trans-cinnamoyl-YPGKF-NH₂ (Hollenberg und Saifeddine 2001) inhibierten den Effekt von Thrombin vollständig.

Somit können PAR₁ und PAR₄ als entscheidende Vermittler des Effekts von Thrombin auf die Aktivierung von p42/p44-MAPK in PHC1-Zellen charakterisiert werden. Interessanterweise ist Thrombin sowohl nach Hemmung von PAR₁ als auch von PAR₄ nicht mehr in der Lage, p42/p44-MAPK zu stimulieren. Dies deutet auf eine funktionelle Interaktion der beiden Thrombinrezeptoren PAR₁ und PAR₄ hin, wonach die Hemmung des einen Rezeptors auch eine Beeinträchtigung bzw. den Verlust der Funktionsfähigkeit des anderen nach sich zieht. Funktionelle Rezeptor-Interaktionsmechanismen über eine Heterodimerbildung bzw. Rezeptor-Transaktivierung sind für PAR₁ und PAR₄ beispielsweise in Blutplättchen (Leger et al. 2006) bzw. für PAR₁ und PAR₂ im Gefäßendothel (Kaneider et al. 2007) beschrieben. In nachfolgenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob auch in PHC1-Zellen ein Rezeptor-Crosstalk zwischen PAR₁ und PAR₄ im p42/p44-MAPK-Signaling vorliegt.

7. Schlussfolgerungen

Im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Proteinase-aktivierten Rezeptoren PAR₁ und PAR₄ eine Thrombin-induzierte Steigerung der Migration von Zellen einer HCC-Primärkultur vermitteln, wobei p42/p44-MAPK involviert sind. Damit konnte ein derartiger migratorischer Signalweg erstmals an primär-kultivierten Tumorzellen dieser epithelialen Tumorentität charakterisiert werden.

Da die Eigenschaften von Primärkulturzellen denen der Tumorzellen im Gewebeverband wesentlich ähnlicher sind als dies bei Zellen permanenter Zelllinien der Fall ist, konnte mit PHC1-Zellen ein zelluläres Modell für Untersuchungen zur Funktion von PARs im HCC entwickelt werden, das eine wesentliche Qualifizierung gegenüber den bisher verwendeten Zelllinien-Modellen HEP-3B und SK-HEP1 darstellt. Deshalb ist auch eine Verwendung derartiger HCC-Primärkulturen in den weiteren Untersuchungen zur Charakterisierung der Funktion von PARs im HCC unbedingt erforderlich. Diese sollten sich zunächst auf eine detaillierte Charakterisierung der Mechanismen der PAR₁- und PAR₄-vermittelten migratorischen Signalweiterleitung konzentrieren. Insbesondere ist die Möglichkeit einer sog. Transaktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen wie EGFR und Met zu berücksichtigen, da gegenwärtige Arbeiten der eigenen Gruppe an permanenten HCC-Zelllinien auf derartige Rezeptorwechselwirkungen hindeuten.

Da eine gesteigerte Fähigkeit von Tumorzellen zur Migration eine ganz wesentliche Voraussetzung für die Invasion und Metastasierung eines Tumors darstellt, liefern die Resultate der vorliegenden Arbeit weitere Hinweise für eine Funktion der Proteinase-aktivierten Rezeptoren 1 und 4 bei der Progression des hepatozellulären Karzinoms. Damit unterstützen sie das Konzept, auf der Grundlage einer kombinierten Hemmung von Thrombin-PAR-Systemen sowie deren Signalweiterleitung ein neues Behandlungsprinzip des hepatozellulären Karzinoms zu entwickeln. Zur Realisierung einer derartigen Strategie sind nachfolgend neben weiteren umfangreichen in-vitro-Untersuchungen zum komplexen migratorischen und invasiven PAR₁/PAR₄-Signaling in HCC-Zellen insbesondere Experimente an HCC-Tiermodellen mit geeigneten Rezeptorantagonisten sowie Inhibitoren der PAR-assoziierten Signalweiterleitung notwendig.

8. Literaturverzeichnis

Ahn NG, Seger R, Bratlien RL, Diltz CD, Tonks NK, Krebs EG. (1991)

Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase. J Biol Chem 266:4220-4227.

Ahn HS, Foster C, Boykow G, Stanford A, Manna M, Graziano M. (2000)

Inhibition of cellular action of thrombin by N3-cyclopropyl-7-[[4-(1-methylethyl)-phenyl]methyl]-7H-pyrrolo[3, 2-f]quinazoline-1,3-diamine (SCH79797), a nonpeptide thrombin receptor antagonist. Biochem Pharmacol 60:1425-1434.

Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sihanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ, Cowley S. (1994)

Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. EMBO J 13:1610-1619.

Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. (1995)

PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. J Biol Chem 270:27489-27494.

Arakawa M, Kage M, Sugihara S, Nakashima T, Suenaga M, Okuda K. (1986)

Emergence of malignant lesions within an adenomatous hyperplastic nodule in a cirrhotic liver. Observations in five cases. Gastroenterology 91:198-208.

Arora P, Ricks TK, Trejo J. (2007)

Protease-activated receptor signalling, endocytotic sorting and dysregulation in cancer. J Cell Sci 120:921-928.

Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD. (1998)

The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. Nat Neurosci 17:602-609.

Avila MA, Berasain C, Sangro B, Prieto J. (2006)

New therapies for hepatocellular carcinoma. Oncogene 25:3866-3884.

Babich M, King KL, Nissenson RA. (1990)

Thrombin stimulates isositol phosphate production and intracellular free calcium by a pertussis toxin-insensitive mechanism in osteosarcoma cells. Endocrinology 126:948-954.

Befeler AS und Bisceglie AM. (2002)

Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. Gastroenterology 122:1609-1619.

Bergmann S, Junker K, Henklein P, Hollenberg MD, Settmacher U, Kaufmann R. (2006)

PAR-type thrombin receptors in renal carcinoma cells: PAR1-mediated EGFR activation promotes cell migration. Oncol Rep 15:889-893.

Berra E, Milanini J, Richard DE, Le Gall M, Vinals F, Gothie E, Roux D, Pages G, Pouyssegur J. (2000)

Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. Biochem Pharmacol 60:1171-1178.

Birth M. (2005)

Kongressbericht: Interdisziplinäres Management von Lebertumoren. Dtsch Arztebl 102:A-1521.

Bogoyevitch MA und Court NW. (2004)

Counting on mitogen-activated protein kinases-ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. Cell Signal 16:1345-1354.

Böhm SK, Kong W, Bromme D, Smeekens SP, Anderson DC, Connolly A, Kahn M, Nelken NA, Coughlin SR, Payan DG, Bunnett NW. (1996)

Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. Biochem J 314:1009-1016.

Böhm SK, Grady EF, Bunnett NW. (1997)

Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. Biochem J 322:1-18.

Boire A, Covic L, Agarwal A, Jaques S, Sherifi S, Kuliopulos A. (2005)

PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. Cell 120:303-313.

Bosch FX, Ribes J, Cleries R, Diaz M. (2005)

Epidemiology of hepatocellular carcinoma. Clin Liver Dis 9:191-211.

Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH. (1990)

An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle

control. Science 249:64-67.

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. (1991)

ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. Cell 65:663-675.

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. (1990)

The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. Nature 348:125-132.

Bruix J und Llovet JM. (2002)

Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. Hepatology 35:519-524.

Buresi MC, Buret AG, Hollenberg MD, MacNaughton WK. (2002)

Activation of proteinase-activated receptor 1 stimulates epithelial chloride secretion through a unique MAP kinase- and cyclo-oxygenase-dependent pathway. FASEB J 16:1515-1525.

Calvisi DF, Pascale RM, Feo F. (2007)

Dissection of signal transduction pathways as a tool for the development of targeted therapies of hepatocellular carcinoma. Rev Recent Clin Trials 2:217-236.

Camerer E, Qazi AA, Duong D, Cornelissen I, Advincula R, Coughlin SR. (2004)

Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. Blood 104:397-401.

Castells A, Bruix J, Brú C, Ayuso C, Roca M, Boix L, Vilana R, Rodés J. (1995)

Treatment of hepatocellular carcinoma with tamoxifen: a double-blind placebo-controlled trial in 120 patients. Gastroenterology 109:917-922.

Caterina MJ und Devreotes PN. (1991)

Molecular insights into eukaryotic chemotaxis. FASEB J 5:3078-3085.

Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, Liang DC, Shau WY, Chen DS. (1997)

Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. N Engl J Med 336:1906-1907.

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH. (2001)

MAP kinases. Chem Rev 101:2449-2476.

Clapham DE und Neer EJ. (1993)

New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. Nature 365:403-406.

Clapham DE und Neer EJ. (1997)

G protein beta gamma subunits. Annu Rev Pharmacol Toxicol 37:167-203.

Cocks TM und Moffatt JD. (2000)

Protease-activated receptors: sentries for inflammation? Trends Pharmacol Sci 21:103-108.

Corvera CU, Dery O, McConalogue K, Gamp P, Thoma M, Al-Ani B, Caughey GH, Hollenberg MD, Bunnett NW. (1999)

Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors-1 and -2. J Physiol 517:741-756.

Cotecchia S, Ostrowski J, Kjelsberg MA, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1992)

Discrete amino acid sequences of the alpha 1-adrenergic receptor determine the selectivity of coupling to phosphatidylinositol hydrolysis. J Biol Chem 267:1633-1639.

Coughlin SR. (2000)

Thrombin signalling and protease-activated receptors. Nature 407:258-264.

Covic L, Gresser AL, Talavera J, Swift S, Kuliopulos A. (2002).

Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. Proc Natl Acad Sci USA 99:643-648.

Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Laburthe M. (2003)

Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. Am J Pathol 162:1503-1513.

D'Andrea MR, Derian CK, Leturcq D, Baker SM, Brunmark A, Ling P, Darrow AL, Santulli RJ, Brass LF, Andrade-Gordon P. (1998)

Characterization of protease-activated receptor-2 immunoreactivity in normal human tissues. J Histochem Cytochem 46:157-164.

D'Andrea MR, Derian CK, Santulli RJ, Andrade-Gordon P. (2001)

Differential expression of protease-activated receptors-1 and -2 in stromal fibroblasts of normal, benign, and malignant human tissues. *Am J Pathol* 158:2031-2041.

de Garavilla L, Vergnolle N, Young SH, Ennes H, Steinhoff M, Ossovskaya VS, D'Andrea MR, Mayer EA, Wallace JL, Hollenberg MD, Andrade-Gordon P, Bunnett NW. (2001)

Agonists of proteinase-activated receptor 1 induce plasma extravasation by a neurogenic mechanism. *Br J Pharmacol* 133:975-987.

Dent P, Reardon DB, Morrison DK, Strugill TW. (1995)

Regulation of Raf-1 and Raf-1 mutants by Ras-dependent and Ras-independent mechanisms in vitro. *Mol Cell Biol* 15:4125-4135.

Déry O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW. (1998)

Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signalling by serine proteases. *Am J Physiol* 274:C1429-1452.

Dietrich CG, Geier A, Tacke J, Gartung C, Matern S. (2003)

Therapie des hepatozellulären Karzinoms. *Dtsch Arztebl* 100:A772-782.

Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. (1995)

A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7686-7689.

Edamoto Y, Hara A, Biernat W, Terraciano L, Cathomas G, Riehle HM, Matsuda M, Fujii H, Scoazec JY, Ohgaki H. (2003)

Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis. *Int J Cancer* 106:334-341.

Even-Ram S, Uziely B, Cohen P, Grisaru-Granovsky S, Maoz M, Ginzburg Y, Reich R, Vlodavsky I, Bar-Shavit R. (1998)

Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat Med* 4:909-914.

Even-Ram SC, Maoz M, Pokroy E, Reich R, Katz BZ, Gutwein P, Altevogt P, Bar-Shavit R. (2001)

Tumor cell invasion is promoted by activation of protease activated receptor-1 in cooperation with alpha v beta 5 integrin. *J Biol Chem* 276:10952-10962.

Farooq A und Zhou MM. (2004)

Structure and regulation of MAPK phosphatases. Cell Signal 16:769-779.

Faruqi TR, Weiss EJ, Shapiro MJ, Huang W, Coughlin SR. (2000)

Structure-function analysis of protease-activated receptor 4 tethered ligand peptides. Determinants of specificity and utility in assays of receptor function. J Biol Chem 275:19728-19734.

Feng DY, Zheng H, Tan Y, Cheng RX. (2001)

Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance. World J Gastroenterol 7:33-36.

Fischer EG, Ruf W, Mueller BM. (1995)

Tissue factor-initiated thrombin generation activates the signaling thrombin receptor on malignant melanoma cells. Cancer Res 55:1629-1632.

Frost JA, Steen H, Shapiro P, Lewis T, Ahn N, Shaw PE, Cobb MH. (1997)

Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. EMBO J 16:6426-6438.

Fu H, Xia K, Pallas DC, Cui C, Conroy K, Narsimhan RP, Mamon H, Collier RJ, Roberts TM. (1994)

Interaction of the protein kinase Raf-1 with 14-3-3 proteins. Science 266:126-129.

Garcia-Ranea JA und Valencia A. (1998)

Distribution and functional diversification of the ras superfamily in Saccharomyces cerevisiae. FEBS Lett 434:219-225.

Gasic G, Gasic T, Stewart C. (1968)

Antimetastatic effects associated with platelet reduction. Proc Natl Acad Sci USA 61: 46-52.

Geier A, Gartung C, Staatz G, Nguyen HN, Matern S. (2001)

Diagnostik benignen und malignen Raumforderungen der Leber. Dtsch Arztebl 98:A3120-3131.

Gerszten RE, Chen J, Ishii M, Ishii K, Wang L, Nanevich T, Turck CW, Vu TK, Coughlin SR. (1994)

Specificity of the thrombin receptor for agonist peptide is defined by its extracellular

surface. Nature 368:648-651.

Gratio V, Walker F, Lehy T, Laburthe M, Darmoul D. (2008)

Abberant expression of proteinase-activated receptor 4 promotes colon cancer cell proliferation through a persistent signalling that involves Src and ErbB-2 kinase. Int J Cancer, noch nicht veröffentlicht).

Greten TF, Papendorf F, Bleck JS, Kirchhoff T, Wohlberedt T, Kubicka S, Klempnauer J, Galanski M, Manns MP. (2005)

Survival rate in patients with hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis of 389 patients. Br J Cancer 92:1862-1868.

Greten TF, Wedemeyer H, Manns MP. (2006)

Prävention Virus-assoziiierter Karzinomentstehung. Dtsch Arztebl 103:A1817-1822.

Hagemann C und Rapp UR. (1999)

Isotype-specific functions of Raf kinases. Exp Cell Res 253:34-46.

Hansen KK, Saifeddine M, Hollenberg MD. (2004)

Tethered ligand-derived peptides of proteinase-activated receptor 3 (PAR3) activate PAR1 and PAR2 in Jurkat T cells. Immunology 112:183-190.

Heider I, Schulze B, Oswald E, Henklein P, Scheele J, Kaufmann R. (2004)

PAR1-type thrombin receptor stimulates migration and matrix adhesion of human colon carcinoma cells by a PKCepsilon-dependent mechanism. Oncol Res 14:475-482.

Hein L, Ishii K, Coughlin SR, Kobilka BK. (1994)

Intracellular targeting and trafficking of thrombin receptors. A novel mechanism for resensitization of a G protein-coupled receptor. J Biol Chem 269:27719-27726.

Henne-Bruns D, Dürig M, Kremer B. (2003)

Duale Reihe Chirurgie. 2., korrigierte Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 519-521.

Herbert JM, Dupuy E, Laplace MC, Zini JM, Bar Shavit R, Tobelem G. (1994)

Thrombin induces endothelial cell growth via both a proteolytic and a non-proteolytic pathway. Biochem J 303:227-231.

Herold G, Aliani S, Beckers H, Braun RP, Deuss U, Drexler H, Faber L, Gawaz M, Germing U, Hagenström H, Harten P, Heintges T, Hönig W, Janssen A, Kaemmerer H, Kindler J, Krebs P, Mellwig KP, Mellinghoff A, Mödder G, Moll S, Oette M, Sauer W, Schmidt HK, Weber AA. (2005)

Tumoren der Leber. In: Herold G., Hrsg. Innere Medizin 2005. Köln, 478-481.

Höpfner M, Schuppan D, Scherübl H. (2008)

Growth factor receptors and related signalling pathways as targets for novel treatment strategies of hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol 14:1-14.

Hollenberg MD und Compton SJ. (2002)

International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. Pharmacol Rev 54:203-217.

Hollenberg MD und Saifeddine M. (2001)

Proteinase-activated receptor 4 (PAR4): activation and inhibition of rat platelet aggregation by PAR4-derived peptides. Can J Physiol Pharmacol 79:439-442.

Howell DC, Laurent GJ, Chambers RC. (2002)

Role of thrombin and its major cellular receptor, protease-activated receptor-1, in pulmonary fibrosis. Biochem Soc Trans 30:211-216.

Howells GL, Macey MG, Chinni C, Hou L, Fox MT, Harriott P, Stone SR. (1997)

Proteinase-activated receptor-2: expression by human neutrophils. J Cell Sci 110:881-887.

Hoxie JA, Ahuja M, Belmonte E, Pizarro S, Parton R, Brass LF. (1993)

Internalization and recycling of activated thrombin receptors. J Biol Chem 268:13756-13763.

Hung DT, Wong YH, Vu TK, Coughlin SR. (1992)

The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. J Biol Chem 267:20831-20834.

Ikeda M, Okusaka T, Ueno H, Takezako Y, Morizane C. (2005)

A phase II trial of continous infusion of 5-fluorouracil, mitoxantrone, and cisplatin for metastatic hepatocellular carcinoma. Cancer 103:756-762.

Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR. (1997)

Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. Nature 386:502-506.

Ito Y, Sasaki Y, Horimoto M, Wada S, Tanaka Y, Kasahara A, Ueki T, Hirano T, Yamamoto H, Fujimoto J, Okamoto E, Hayashi N, Hori M. (1998)

Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 27:951-958.

Johnson PJ. (2000)

Systemic chemotherapy of liver tumors. *Semin Surg Oncol* 19:116-124.

Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV Jr, Tam C, Coughlin SR. (1998)

A dual Thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394:690-694.

Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR. (1999)

Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest* 103:879-887.

Kaneider NC, Leger AJ, Agarwal A, Nguyen N, Perides G, Derian C, Covic L, Kuliopulos A. (2007)

'Role reversal' for the receptor PAR₁ in sepsis-induced vascular damage. *Nat Immunol* 8:1303-1312.

Kanthou C, Kanse SM, Kakkar VV, Benzakour O. (1996)

Involvement of pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins in alpha-thrombin signalling on cultured human vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* 8:59-66.

Katz ME und McCormick F. (1997)

Signal transduction from multiple Ras effectors. *Curr Opin Genet Dev* 7:75-79.

Kaufmann R, Patt S, Schafberg H, Kalff R, Neupert G, Nowak G. (1998)

Functional thrombin receptor PAR1 in primary cultures of human glioblastoma cells. *Neuroreport* 9: 709-712.

Kaufmann R, Patt S, Kraft R, Zieger M, Henklein P, Neupert G, Nowak G. (1999)

PAR 1-type thrombin receptors are involved in thrombin-induced calcium signaling in human meningioma cells. *J Neurooncol* 42:131-136.

Kaufmann R, Patt S, Zieger M, Kraft R, Tausch S, Henklein P, Nowak G. (2000)

The two-receptor system PAR-1/PAR-4 mediates alpha-thrombin-induced [Ca²⁺] mobilization in human astrocytoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 126:91-94.

Kaufmann R, Junker U, Nuske K, Westermann M, Henklein P, Scheele J, Junker K. (2002)

PAR-1- and PAR-3-type thrombin receptor expression in primary cultures of human renal cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 20:177-180.

Kaufmann R, Schulze B, Krause G, Mayr LM, Settmacher U, Henklein P. (2005)

Proteinase-activated receptors (PARs)-the PAR3 Neo-N-terminal peptide TFRGAP interacts with PAR1. *Regul Pept* 125:61-66.

Kaufmann R, Rahn S, Pollrich K, Hertel J, Dittmar Y, Hommann M, Henklein P, Biskup C, Westermann M, Hollenberg MD, Settmacher U. (2007)

Thrombin-mediated hepatocellular carcinoma cell migration: Cooperative action via proteinase-activated receptors 1 and 4. *J Cell Physiol* 211:699-707.

Keogh RJ, Houliston RA, Wheeler-Jones CP. (2002)

Thrombin-stimulated Pyk2 phosphorylation in human endothelium is dependent on intracellular calcium and independent of protein kinase C and Src kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 294:1001-1008.

Klages B, Brandt U, Simon MI, Schultz G, Offermanns S. (1999)

Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol* 144:745-754.

Klein PJ, Schmidt CM, Wiesenauer CA, Choi JN, Gage EA, Yip-Schneider MT, Wiebke EA, Wang Y, Omer C, Sebolt-Leopold JS. (2006)

The effects of a novel MEK inhibitor PD184161 on MEK-ERK signaling and growth in human liver cancer. *Neoplasia* 8:1-8.

Kuliopulos A, Covic L, Seeley SK, Sheridan PJ, Helin J, Costello CE. (1999)

Plasmin desensitization of the PAR1 thrombin receptor: kinetics, sites of truncation, and implications for thrombolytic therapy. *Biochemistry* 38:4572-4585.

Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. (1994)

Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* 369:621-628.

Lazar T, Gotte M, Gallwitz D. (1997)

Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell? *Trends Biochem Sci* 22:468-472.

Leger AJ, Jacques SL, Badar J, Kaneider NC, Derian CK, Andrade-Gordon P, Covic L, Kuliopulos A. (2006)

Blocking the protease-activated receptor 1-4 heterodimer in platelet-mediated thrombosis. *Circulation* 113:1244-1254.

Liu JH, Chen PW, Asch SM, Busuttil RW, Ko CY. (2004)

Surgery for hepatocellular carcinoma: does it improve survival? *Ann Surg Oncol* 11:298-303.

Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. (2003)

Hepatocellular Carcinoma. *Lancet* 362:1907-1917.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951)

Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

Lu YS, Hsu C, Li CC, Kuo SH, Yeh KH, Yang CH, Hsu CH, Wu Cy, Cheng AL. (2004)

Phase II study of combination doxorubicin, interferon-alpha, and high-dose tamoxifen treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 51:815-819.

Luttrell LM und Lefkowitz RJ. (2002)

The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115:455-465.

Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. (2001)

Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53:245-282.

Marais R, Light Y, Paterson HF, Marshall CJ. (1995)

Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 14:3136-3145.

Marinissen MJ und Gutkind JS. (2001)

G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22:368-376.

McRedmond JP, Harriott P, Walker B, Fitzgerald DJ. (2000)

Streptokinase-induced platelet activation involves antistreptokinase antibodies and cleavage of protease-activated receptor-1. *Blood* 95:1301-1308.

McKillop IH, Moran DM, Jin X, Koniaris LG. (2006)

Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Surg Res* 136:125-135.

Mirza H, Yatsula V, Bahou WF. (1996)

The proteinase activated receptor-2 (PAR-2) mediates mitogenic responses in human vascular endothelial cells. J Clin Invest 97:1705-1714.

Molino M, Blanchard N, Belmonte E, Traver AP, Abrams C, Hoxie JA, Cerletti C, Brass LF. (1995)

Proteolysis of the human platelet and endothelial cell thrombin receptor by neutrophil-derived cathepsin G. J Biol Chem 270:11168-11175

Morrison DK und Cutler RE. (1997)

The complexity of Raf-1 regulation. Curr Opin Cell Biol 9:174-179.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986)

Specific enzymatic amplification of DANN in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1:263-273

Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludemann MJ, Coughlin SR. (2000)

PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. Nature 404:609-613.

Nanevicz T, Ishii M, Wang L, Chen M, Chen J, Turck CW, Cohen FE, Coughlin SR. (1995)

Mechanisms of thrombin receptor agonist specificity. Chimeric receptors and complementary mutations identify an agonist recognition site. J Biol Chem 270:21619-21625.

Neves SR, Ram PT, Iyengar R. (2002)

G protein pathways. Science 296:1636-1639.

Nierodzik ML, Kajumo F, Karparkin S. (1992)

Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets in vitro and tumor metastasis in vivo. Cancer Res 52:3267-3272.

Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. (1994)

Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. Proc Natl Acad Sci USA 91:9208-9212.

O'Brien PJ, Prevost N, Molino M, Hollinger MK, Woolkalis MJ, Woulfe DS, Brass LF. (2000)

Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1. J Biol Chem

275:13502-13509.

Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G. (1994)

G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. Proc Natl Acad Sci USA 91:504-508.

Offermanns S. (2001)

In vivo functions of heterotrimeric G-proteins: studies in G α -deficient mice. Oncogene 20:1635-1642.

Okuda K. (2000)

Hepatocellular carcinoma. J Hepatol 32:225-237.

Ossovskaya VS und Bunnett NW. (2004)

Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. Physiol Rev 84:579-621.

Paduch M, Jelen F, Otlewski J. (2001)

Structure of small G proteins and their regulators. Acta Biochem Pol 48:829-850.

Paing MM, Stutts AB, Kohout TA, Lefkowitz RJ, Trejo J. (2002)

beta-Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation. J Biol Chem 277:1292-1300.

Palczewski D und Dawidowski W. (2000)

Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. Science 289:739-745.

Palumbo JS, Kombrinck KW, Drew AF, Grimes TS, Kiser JH, Degen JL, Bugge TH. (2000)

Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. Blood 96:3302-3309.

Parkin DM. (2001)

Global cancer statistics in the year 2000. Lancet Oncol 2:533-43. Erratum in Lancet Oncol 2:596.

Pawson T und Scott JD. (1997)

Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. Science 278:2075-2080.

Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW. (1991)

Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein

kinase (MAP kinase). EMBO J 10:885-892.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. (2001)

Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev 22:153-183.

Peterson GL. (1979)

Review of the Folin phenol protein quantitation of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. Anal Biochem 100:201-220.

Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. (1999)

Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. Int J Cancer 83:18-29: Erratum in: Int J Cancer 83:870-3.

Ramachandran R und Hollenberg MD. (2008)

Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. Br J Pharmacol 153 Suppl 1:S3263-3282.

Rasmussen UB, Vouret-Craviari V, Jallat S, Schlesinger Y, Pages G, Pavirani A, Lecocq JP, Pouyssegur J, Van Obberghen-Schilling E. (1991)

cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization. FEBS Lett 288:123-128.

Rattenholl A und Steinhoff M. (2003)

Role of proteinase-activated receptors in cutaneous biology and disease. In: Hollenberg M and Vergnolle N, Hrsg. Drug Development Research. 5. Aufl. New York: Wiley-Liss-Verlag, 408-417.

Renesto P, Si-Tahar M, Moniatte M, Balloy V, Van Dorsselaer A, Pidard D, Chignard M. (1997)

Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin G, and proteinase 3: evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor. Blood 89:1944-1953.

Rickles FR und Edwards RL. (1983)

Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited. Blood 62: 14-31.

Riede UN, Werner M, Schaefer HE. (2004)

Allgemeine und spezielle Pathologie. 5., kompl. überarb. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Riewald M and Ruf W. (2001)

Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. Proc Natl Acad Sci USA 98:7742-7747.

Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. (2002)

Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. Science 296:1880-1882.

Ross EM und Gilman AG. (1980)

Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. Annu Rev Biochem 49:533-564.

Rudroff C, Schafberg H, Nowak G, Weinelt R, Scheele J, Kaufmann R. (1998)

Characterization of functional thrombin receptors in human pancreatic tumor cells (MIA PACA-2). Pancreas 16:189-194.

Rudroff C, Seibold S, Kaufmann R, Zetina CC, Reise K, Schafer U, Schneider A, Brockmann M, Scheele J, Neugebauer EA. (2002)

Expression of the thrombin receptor PAR-1 correlates with tumor cell differentiation of pancreatic adenocarcinoma in vitro. Clin Exp Metastasis 19:181-189.

Rullier A, Senant N, Kisiel W, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Le Bail B, Rosenbaum J. (2006)

Expression of protease-activated receptors and tissue factor in human liver. Virchows Arch 448:46-51.

Sabri A, Short J, Guo J, Steinberg SF. (2002)

Protease-activated receptor-1-mediated DNA synthesis in cardiac fibroblast is via epidermal growth factor receptor transactivation: distinct PAR-1 signaling pathways in cardiac fibroblasts and cardiomyocytes. Circ Res 91:532-539.

Sabri A, Guo J, Elouardighi H, Darrow AL, Andrade-Gordon P, Steinberg SF. (2003)

Mechanisms of proteinase-activated receptor-4 actions in cardiomyocytes. Role of Src tyrosin kinase. J Biol Chem 278:11714-11720.

Salah Z, Maoz M, Pokroy E, Lotem M, Bar-Shavit R, Uziely B. (2007)

Protease-activated receptor-1 (hPar1), a survival factor eliciting tumor progression. *Mol Cancer Res* 5:229-240.

Salah Z, Haupt S, Maoz M, Baraz L, Rotter V, Peretz T, Haupt Y, Bar-Shavit R. (2008)

p53 controls hPAR₁ function and expression. *Oncogene* 27:6866-6877.

Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. (2001)

Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 413:74-78.

Schmidt CM, McKillop IH, Cahill PA, Sitzmann JV. (1997)

Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 236:54-58.

Schramek H. (2002)

MAP kinases: from intracellular signals to physiology and disease. *News Physiol Sci* 17:62-67.

Schwartz JD und Beutler AS. (2004)

Therapy for unresectable hepatocellular carcinoma: review of the randomized clinical trials-II: systemic and local non-embolization-based therapies in unresectable and advanced hepatocellular carcinoma. *Anticancer Drugs* 15:439-452.

Shapiro MJ und Coughlin SR. (1998)

Separate signals for agonist-independent and agonist-triggered trafficking of protease-activated receptor 1. *J Biol Chem* 273:29009-29014.

Shapiro MJ, Weiss EJ, Faruqi TR, Coughlin SR. (2000)

Protease-activated receptors 1 and 4 are shut off with distinct kinetics after activation by thrombin. *J Biol Chem* 275:25216-25221.

Shi X, Gangadharan B, Brass LF, Ruf W, Mueller BM. (2004)

Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol Cancer Res* 2:395-402.

Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. (1991)

Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252:802-808.

Smedile A and Bugianesi E. (2005)

Steatosis and hepatocellular carcinoma risk. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 9:291-293.

Steinhoff M, Boddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, Luger TA, Hollenberg MD. (2005)

Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling on inflammation and immune response. *Endocr Rev* 26:1-43.

Strobel D und Bernatik T. (2005)

Diagnostik bei fokalen Leberläsionen. *Dtsch Arztebl* 103:A 789-793.

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. (2001)

Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81:153-208.

Takayama T, Makuuchi M, Hirohashi s, Sakamoto M, Okazaki N, Takayasu K, Kosuge T, Motoo Y, Yamazaki S, Hasegawa H. (1990)

Malignant transformation of adenomatous hyperplasia to hepatocellular carcinoma. *Lancet* 336:1150-1153.

Tateishi R, Yoshida H, Shiina S, Imamura H, Hasegawa K, Teratani T, Obi S, Sato s, Koike Y, Fujishima T, Makuuchi M, Omata M. (2005)

Proposal of a new prognostic model for hepatocellular carcinoma: an analysis of 403 patients. *Gut* 54:328-329.

Thomson S, Clayton AL, Hazzalin CA, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC. (1999)

The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *EMBO J* 18:4779-4793.

Tsuboi Y, Ichida T, Sugitani S, Genda T, Inayoshi J, Takamura M, Matsuda Y, Nomoto M, Aoyagi Y. (2004)

Overexpression of extracellular signal-related protein kinase and its correlation with proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 24:432-436.

Vergnolle N. (2000)

Review article: proteinase-activated receptors - novel signals for gastrointestinal pathophysiology. *Aliment Pharmacol Ther* 14:257-266.

Verrall S, Ishii M, Chen M, Wang L, Tram T, Coughlin SR. (1997)

The thrombin receptor second cytoplasmic loop confers coupling to Gq-like G proteins in chimeric receptors. Additional evidence for a common transmembrane signaling and G protein coupling mechanism in G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 272:68898-68902.

Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. (2007)

Genomics and signalling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 27:55-76.

Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. (1991a)

Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64:1057-1068.

Vu TK, Wheaton VI, Hung DT, Charo I, Coughlin SR. (1991b)

Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature* 353:674-677.

Wang H, Uhl JJ, Stricker R, Reiser G. (2002)

Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C1351-1364.

Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA. (1997)

Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J* 16:1909-1920.

Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. (1999)

Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79:143-180.

Wilhelm S und Chien DS. (2002)

BAY 43-9006: preclinical data. *Curr Pharm Des* 8:2255-2257.

www.destatis.de (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden).

Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC. (1998)

Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6642-6646.

Yin YJ, Salah Z, Grisaru-Granovsky S, Cohen I, Even-Ram SC, Maoz M, Uziel B, Peretz T, Bar-Shavit R. (2003)

Human protease-activated receptor 1 expression in malignant epithelia: a role in invasiveness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:940-944.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die das Gelingen dieser Arbeit unterstützt und ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. U. Settmacher der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Jena, für die Überlassung des Themas und die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten im Labor,

Herrn Dr. R. Kaufmann, Leiter des Forschungslabors der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Jena, für die umfassende Betreuung dieser Arbeit, das entgegengebrachte Vertrauen, das Engagement, die steten Anregungen sowie die Geduld,

den Mitarbeiterinnen des Forschungslabors der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Jena, Frau B. Schulze und Frau E. Oswald für die fachliche Unterstützung, die lehrreiche Zusammenarbeit und die sehr gute Arbeitsatmosphäre

und meiner Familie für die Unterstützung während des Studiums und der Promotionszeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kristin Zwenzner, geb. Pollrich
Geburtsdatum / -ort: 27.08.1981 in Weida
Familienstand: verheiratet, 1 Sohn
Staatsangehörigkeit: deutsch
Anschrift: Jean-Paul Str. 54, 95444 Bayreuth

Schullaufbahn und Studium:

09/1992 - 07/2000 Johann-Heinrich-Pestalozzi-Gymnasium Rodewisch
Abschluss: Abitur
10/2000 - 10/2006 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Abschluss: Staatsexamen
02/2004 – 02/2009 Doktorandin im Forschungslabor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Direktor: Prof. Dr. U. Settmacher, Universitätsklinikum Jena

Berufliche Laufbahn:

seit 03/2008 Assistenzärztin in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Bayreuth

Ort, Datum

Unterschrift:

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. U. Settmacher, Herr Dr. R. Kaufmann, Frau B. Schulze, Frau E. Oswald,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers